

BESTIMMUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN EPITOPE DER
BAKTERIELLEN ZELLWAND MIT HILFE EINES
HAPTENBINDUNGSTESTS UND EINES
ENZYME - LINKED - IMMUNOSORBENT - ASSAYS
BEI PATIENTEN MIT SEPTISCHEN ERKRANKUNGEN

GABRIELE SCHMITTLEIN

Disbui. München
1988

Aus dem Institut für Klinische Chemie am
Städtischen Krankenhaus München-Harlaching

Vorstand: Prof. Dr. L. Weiß

Bestimmung von Antikörpern gegen Epitope der
bakteriellen Zellwand mit Hilfe eines Hapten-
bindungstests und eines Enzyme-Linked-Immuno-
sorbent-Assays bei Patienten mit septischen
Erkrankungen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gabriele Schmittlein

aus
München

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. L. Weiß
Mitberichterstatter:	Professor Dr. M. Knedel Professor Dr. F. Deinhardt
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Professor Dr. H. Kolb, TU München
Dekan:	Professor Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	21.01.1988

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Infektionskrankheiten: Septikämie und Endokarditis	1
1.2. Aufbau der bakteriellen Zellwand unter besonderer Berücksichtigung des Peptidoglycans	4
1.3. Ziel der Arbeit	7
2. Auswahl des Patientenkollektives und Versuchsinhalt	8
2.1. Das Patientenkollektiv	8
2.2. Versuchsinhalt	9
3. Beschreibung der Methoden	11
3.1. Der ^{125}J -Haptenbindungstest	11
3.1.1. Prinzip	11
3.1.2. Markierung des Peptids mit N-Succinimidyl-3-(4-Hydroxy-5- ^{125}J -Jodophenyl)-Propionat	12
3.1.3. Durchführung des ^{125}J -Haptenbindungstests	12
3.1.4. Testauswertung	13
3.1.5. Präzision der Methode	13
3.2. Der ELISA zur Erfassung von IgG-Antikörpern gegen die Sequenz R-D-Ala-D-Ala	14
3.2.1. Prinzip	14
3.2.2. Synthese von Protein-Peptid-Konjugaten	15
3.2.3. Durchführung des ELISA	15
3.2.4. Testauswertung und Quantifizierung	16
3.2.5. Präzision der Methode	17
3.3. Bestimmung des Antistreptolysin-O-Titers	17
3.3.1. Prinzip	17
3.3.2. Durchführung	17
3.4. Bestimmung der Immunglobuline G und M	18
3.4.1. Prinzip	18
3.4.2. Durchführung	19

	Seite
4. Ergebnisse	20
4.1. Beispiele für die Auswertung der Meßwerte	20
4.1.1. Bindekurven von Seren im ^{125}J -Haptenbindungstest	20
4.1.2. Bindekurven von Seren im ELISA und Quantifizierung	21
4.2. Ergebnisse der Messungen bei den Langzeit-Patienten	24
4.3. Ergebnisse der Messungen bei den übrigen Patienten	39
4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse bei allen Patienten	45
4.5. Vergleich der Serumbindung im Haptenbindungstest und im ELISA	48
5. Diskussion	49
5.1. Zu den beiden Testarten	49
5.2. Spezifische Ergebnisse bei den verschiedenen Keimen	52
5.3. Erörterung einiger grundsätzlicher Probleme	58
6. Zusammenfassung	63
7. Literaturverzeichnis	65

Verwendete Abkürzungen

Ala	Alanin
BK	Blutkultur
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
E.	Escherichia
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
ΔE	Differenz optischer Dichten
FCS	Fötales Kälberserum
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HSA	Humanserumalbumin
Ig	Immunglobulin
Klebs.	Klebsiella
Lys	Lysin
M	molar
OD	optische Dichte
PBS-T20	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung + 0,2 % Tween 20
RIA	Radio-Immuno-Assay
Staph.	Staphylococcus
Str.	Streptococcus
U	units (μ Mol Umsatz/mg Protein)

1. Einleitung

1.1. Infektionskrankheiten: Septikämie und Endokarditis

Bakterielle Infektionen können auch heute, in der Ära der Antibiotika, häufig noch sehr gefürchtete Erkrankungen sein. Im Krankenhausbereich stellen sie Ärzte und Pflegepersonal vor schwer zu lösende Probleme, besonders wenn sie als zusätzliche Komplikationen anderer Erkrankungen, als Sekundärinfektionen oder als nosokomiale Infektionen auftreten.

Bei den bakteriellen Erkrankungen unterscheidet man zwischen lokalisierten und septischen Verläufen. Lokalisierte Infektionen können als begrenzte Entzündungsvorgänge mit oder ohne Gewebseinschmelzung definiert werden. Beispiele für derartige Krankheitsbilder sind die Appendizitis, die Otitis, die Osteomyelitis, Abszesse in verschiedenen Organen, sowie Furunkel und lokalisierte Wundinfektionen der Haut.

Die Septikämien (traditionelle Bezeichnung "Sepsis") dagegen stellen eine Gruppe von heterogenen Erkrankungen dar, bei denen von einem Sepsisherd ("Focus") im Körper Keime kontinuierlich oder schubweise in die Blutbahn gelangen. Dabei können sowohl Symptome von Absiedelungen als auch Allgemeinerscheinungen klinisch im Vordergrund stehen.

Genaue Zahlen über die Häufigkeit septischer Erkrankungen sind nicht bekannt; zumindest für internistische Stationen erscheint eine Schätzung von 0,5 bis 1 Fall pro Krankenbett im Jahr als realistisch (36).



Für das Zustandekommen und die klinische Manifestation einer Septikämie sind drei Faktoren wichtig:

1. die Art der Erreger
2. die Eintrittspforte bzw. der Focus
3. eine ggf. vorliegende Abwehrschwäche

Die Diagnose "Septikämie" wird gestellt durch

1. das typische klinische Bild und, soweit möglich, auch durch
2. den Erregernachweis in der Blutkultur.

Die verbreitetsten Erreger von Septikämien sind laut einer Statistik der Med. Universitätsklinik Frankfurt (1960 - 1978) an 930 Patienten:

Vergrünende u. anhämolysierende Str.	10,1%
Str. pyogenes	1,2%
Enterokokken	6,5%
Pneumokokken	4,7%
Staph. aureus	14,0%
E. Coli	17,7%
Klebsiella und Enterobacter	6,0%
Pseudomonas	8,9%
Sonstige	30,9%

Als häufige Eintrittspforten der Keime in die Blutbahn kommen in Frage: Hauteiterungen, Venenkatheter, Blasen-katheter, Harnwegsinfektionen, Cholangitis, Adnexitis und Abszesse im Mundbereich (20, 36).

Klinisches Hauptsymptom der Septikämie ist hohes Fieber, typischerweise intermittierend (d.h. mit starken Tages-schwankungen über 2 °C) verbunden mit Schüttelfrösten während des Temperaturanstiegs. Aber das Fieber kann auch als "Kontinua" auftreten (hohe Temperaturen über einen längeren Zeitraum) oder bei schwerkranken und stark ab-

wehrgeschwächten Patienten sogar gänzlich fehlen. Das wichtigste diagnostische Kriterium ist der Erregernachweis in der Blutkultur, der aber häufig schwierig oder gar unmöglich ist. Nahezu beweisend für eine Septikämie sind auch hämorrhagische und pustulöse Hautherde sowie bakterielle Mikroembolien am Augenhintergrund.

Als klinisch chemische Daten finden sich eine hohe Leukozytose mit Linksverschiebung und toxischen Granulationen sowie eine hohe bis maximale BSG. Bei schon längerem Andauern der Krankheit bestehen eine Infektanämie und eine Erhöhung der Gammaglobuline in der Serumproteinelektrophorese.

Die wichtigsten Komplikationen im Verlauf der Septikämie (20, 36) sind die Streuung der Keime in multiple Organe, eventuell mit Abszessbildung, und der besonders gefürchtete septische Schock mit einer Letalität von mehr als 60%. Ebenso gefährlich ist die Ausbildung eines ARDS ("adult respiratory distress syndrome").

Eine Sonderform der Septikämie stellt die bakterielle Endokarditis dar, die häufig subakut verläuft (Endokarditis lenta) und lange unerkannt bleiben kann. Besonders an rheumatisch vorgeschädigten Herzklappen oder bei kongenitalen Vitien kann es im Rahmen sonst harmloser Bakteriämien zu einer bakteriellen Besiedelung des Endokards kommen. Folge davon ist häufig die vollständige Zerstörung der Klappen mit schwersten Insuffizienzerscheinungen. Fieber, Herzgeräusche und Anämie sind die klassischen Symptome, die den Verdacht auf die bakterielle Endokarditis lenken sollten.

Bei den Erregern herrschen grampositive Kokken vor: Staph. aureus und Staph. epidermidis bei der akuten Form der Endokarditis, Streptokokken der Viridans-Gruppe bei der subakuten Form.

In der Blutkultur sind die Keime jedoch nur selten nachweisbar, da sie oft nur intermittierend und in kleinen Mengen in die Blutbahn ausgeschwemmt werden. Bei einer Endokarditis lenta sind zehn oder mehr negative Blutkulturen trotz gesicherter Diagnose (z. B. im Echokardiogramm) keine Seltenheit.

1.2. Aufbau der bakteriellen Zellwand unter besonderer Berücksichtigung des Peptidoglycans

Bakterien sind einzellige, prokaryotische Lebewesen verschiedener Gestalt, die im wesentlichen aus dem Zellkern mit der DNS, aus dem Zytoplasma mit seinen Strukturen und der Zellwand bestehen.

Die starre Zellwand hat die Aufgabe, die Bakterien vor äußeren Noxen zu schützen, die osmotische Druckdifferenz zwischen innen und außen abzufangen und der Zelle die charakteristische äußere Form zu geben (3, 19, 26, 43). Auf Grund des Färbeverhaltens in der Gram-Färbung unterscheidet man grampositive und gramnegative Keime.

Die Zellwand der Grampositiven besteht neben Teichonsäuren vor allem aus einer ca 40 nm dicken Schicht Peptidoglycan (Murein), einem netzartigen Polymer, das den ganzen Zelleib einhüllt. Das Peptidoglycan setzt sich aus unverzweigten Polysaccharidketten von N-Acetyl-D-Muraminsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin zusammen, die alternierend β -1,4-glycosidisch verknüpft sind. An die Carboxylgruppe der Muraminsäure schließt sich in der Regel die Peptideinheit der Sequenz L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-(D-Ala), (Tetrapeptid bzw. Pentapeptid), an. Die Peptideinheiten können entweder direkt (z.B. bei Bazillen) oder über Interpeptidbrücken verknüpft sein (L-Ala₂₋₃ bei Streptokokken oder Gly₅ bei Staphylokokken).

Die Strukturformel des Peptidoglycans ist auf Seite 6 in Abb. 1 dargestellt.

Die Peptidoglycanschicht der Zellwand der gramnegativen Bakterien ist viel dünner (2 - 3 nm) und enthält nicht das Penta-peptid der Peptiduntereinheit.

Bei der Auseinandersetzung der Bakterien mit dem Wirtsorganismus werden dem Peptidoglycan Adjuvanseigenschaften (2, 12), endotoxinähnliche Eigenschaften (10, 24), Immunogenität (1, 23, 29) sowie eine Rolle bei der Auflösung entzündlicher Erkrankungen (4, 7, 11, 18) zugeschrieben.

Im Hinblick auf die Immunogenität wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Testsystemen wie z. B. Latex-Test (27), Agar-Gel-Diffusion (13), "Solid-Phase-Radio-Immuno-Assay" (5, 40, 41, 42), ELISA (18, 39, 44) und Farr-Typ-Hapten-Bindungstest (14, 42) entwickelt, um Antikörper gegen Peptidoglycan oder auch gegen Teichonsäuren nachzuweisen.

Der Nachteil dieser Testsysteme ist, daß sie relativ unspezifisch sind, weil als Antigen angereichertes Peptidoglycan aus *Staph. aureus* verwendet wird und nicht eine genau definierte antigene Determinante. Dies kann zu unspezifischen Bindungen an andere immunogene Determinanten des Peptidoglycans führen. Ebenso ist möglich, daß das Peptidoglycan bei der langwierigen Extraktion aus der bakteriellen Zellwand chemisch verändert wird.

Wie die Literatur zeigt, führen die in Abb. 1 dargestellten fünf Strukturbereiche (Epitope) des Peptidoglycans zur Bildung spezifischer Antikörper:

- a. der Glycanstrang (29, 32)
- b. der N-Terminus der Interpeptidbrücke (34)
- c. der C-Terminus der Interpeptidbrücke (32)
- d. das nicht quervernetzte Tetrapeptid
(L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala) der Peptid-

einheit (9)

e. das nicht quervernetzte Pentapeptid der Peptideinheit mit C-terminalem D-Ala-D-Ala als immundominanter Gruppe (14, 28, 31, 32).

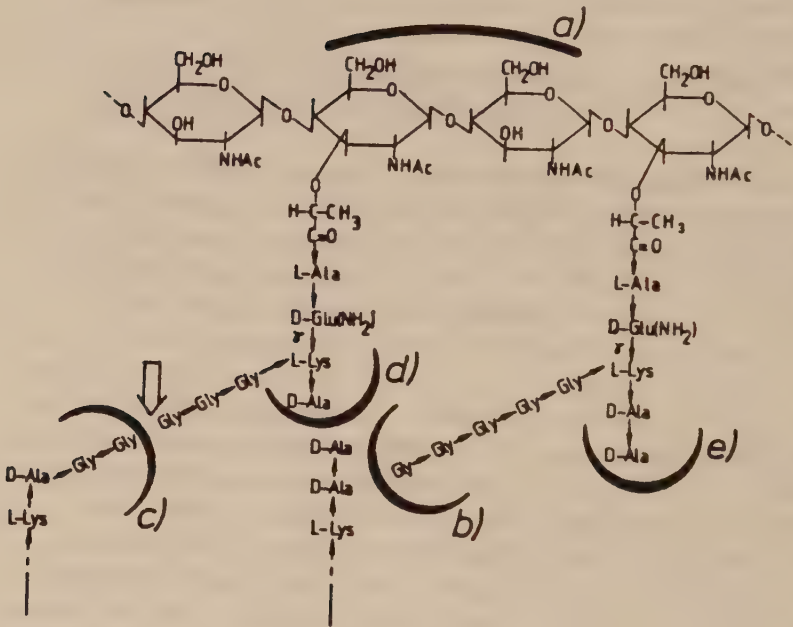


Abb. 1: Struktur des Peptidoglycans
(aus N. Franken, Dissertation (8), S.7)

Der Glycanstrang des Peptidoglycans ist als Epitop den grampositiven und den gramnegativen Bakterien gemeinsam. Das Pentapeptid dagegen ist ein spezifisches Antigen, das überwiegend nur bei Staphylokokken und Streptokokken

vorkommt. Da diese Keime häufige Krankheitserreger sind, könnte dem Nachweis von Antikörpern gegen das Pentapeptid vielleicht große klinische Bedeutung zukommen.

1.3. Ziel der Arbeit

Gerade weil es oft nicht möglich ist, Erreger bakterieller Infektionen direkt in einer Kultur nachzuweisen - man denke besonders an die subakute Endokarditis -, könnte der Nachweis von Antikörpern gegen Zellwandbestandteile ein wichtiges diagnostisches Kriterium werden. Besonders ein Anstieg der Antikörperkonzentration, aber auch eine hohe absolute Konzentration an Antikörpern gegen ein Epitop der Zellwand grampositiver Bakterien würde das Vorliegen einer grampositiven Infektion zumindest sehr wahrscheinlich machen, auch wenn in der Kultur keine Erreger isoliert werden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, bei Patienten mit septisch verlaufenden Erkrankungen über einen längeren Zeitraum hin Antikörper gegen das Pentapeptid des Peptidoglycans zu bestimmen. Mit einem Haptenbindungstest sollen spezifische Immunglobuline der Klassen G, M, A gegen die Sequenz L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala und mit einem ELISA Antikörper der Klasse IgG gegen das C-terminale Ende D-Ala-D-Ala des Pentapeptids erfaßt werden.

2. Auswahl des Patientenkollektives und Versuchsinhalt

2.1. Das Patientenkollektiv

In den Monaten Januar bis Juni 1984 konnten anhand der Blutkulturergebnisse die meisten Patienten erfaßt werden, die in diesem Zeitraum mit septischen Erkrankungen im Städtischen Krankenhaus München-Harlaching lagen. Alle wurden stationär im Krankenhaus, die meisten von ihnen auf Intensivstationen, behandelt. Insgesamt wurden 54 Patienten in einem Alter zwischen 25 und 89 Jahren ausgewählt; das Durchschnittsalter betrug 70,5 Jahre, nur vier Patienten waren jünger als 50 Jahre. 23 Personen waren männlichen, 31 weiblichen Geschlechts.

Die meisten Patienten waren nicht primär wegen Septikämie im Krankenhaus, sondern wegen anderer Grunderkrankungen, als deren Folge sich eine Septikämie entwickelt hatte. Die Informationen über die klinischen Befunde stammen aus den Krankengeschichten und aus persönlichen Gesprächen mit den jeweils zuständigen Stationsärzten. Nur wenn das klinische Bild eindeutig für die Diagnose "Septikämie" sprach, wurden Patienten in die Untersuchung einbezogen. Bei 50 der 54 Patienten ist die Sepsis durch den Erregernachweis gesichert, vier wurden allein auf Grund des klinischen Befundes ausgewählt.

Folgende Keime wurden in den Blutkulturen isoliert:

Staph. aureus	9	Patienten
Str. pyogenes	2	"
vergrünende Streptokokken ¹⁾	11	"
sonstige Streptokokken ²⁾	3	"
Pneumokokken	4	"
Corynebakterien	1	"
E. Coli	13	"
Klebsiellen	5	"
sonstige gramneg. Stäbchen ³⁾	3	"

1) Str. viridans, salivarius, sanguis, bovis, mitis

2) B-Streptokokken, C-Streptokokken, Enterokokken

3) Enterobacter cloacae, Proteus mirabilis

Diese Verteilung entspricht in etwa der Statistik der Med. Universitätsklinik Frankfurt (s. 1.1.).

Häufige Grunderkrankungen der Patienten waren:

Bakterielle Endokarditis (6 Patienten), Pneumonien (10 Patienten), cerebrale Insulte (4 Patienten), Harnwegsinfekte wie Cystitis und Pyelonephritis (15 Patienten), dialysepflichtige Niereninsuffizienz mit Shuntproblemen (3 Patienten), Cholezystitis (6 Patienten), Diabetes mellitus (3 Patienten) sowie maligne Tumoren (8 Patienten).

Alle Patienten wurden massiv antibiotisch therapiert, häufig mit einer Kombination aus einem Breitspektrum-Penicillin oder -Cephalosporin mit einem Aminoglycosid. Bei Urosepsis wurde häufig auch mit Cotrimoxazol behandelt.

Trotz der intensiven Therapie gerieten vier Patienten in einen septischen Schock mit disseminierter intravasaler Gerinnung. Acht Patienten verstarben während des Beobachtungszeitraumes entweder im septischen Schock oder an den Folgen ihrer Grunderkrankungen. Die anderen konnten weitgehend gebessert wieder nach Hause entlassen werden oder wurden zu weiteren therapeutischen Maßnahmen in andere Kliniken verlegt.

2.2. Versuchsinhalt

Von den 54 Patienten kamen insgesamt 163 Serumproben zusammen, die bis zur Durchführung der Messungen bei -30°C gelagert wurden. Alle Blutentnahmen erfolgten durch Ärzte auf den entsprechenden Stationen des Krankenhauses im Rahmen der routinemäßigen Laboruntersuchungen. Auf diese Weise konnten von einigen Patienten, die sich länger stationär aufhielten, mehrere Serumproben (4 - 11) über einen Zeitraum von drei Wochen bis zu einem halben Jahr

gesammelt werden. Der größere Teil der Patienten jedoch wurde früh wieder entlassen, so daß in diesen Fällen nur 1 - 3 Serumproben zusammenkamen.

An allen Seren wurden die unter 3. näher beschriebenen Tests, nämlich der ¹²⁵J-Haptenbindungstest und der ELISA durchgeführt, in denen spezifische Antikörper gegen Epitope der bakteriellen Zellwände nachgewiesen werden. Außerdem wurden bei den Patienten, die über längere Zeit beobachtet werden konnten, die Bestimmung der Immunglobuline G und M sowie des Anti-Streptolysin-O-Titers durchgeführt.

Alle anderen klinischen Daten und Ergebnisse von Laboruntersuchungen, die in dieser Arbeit angegeben sind, stammen aus den Krankengeschichten der Patienten.

3. Beschreibung der Methoden

3.1. Der ^{125}J -Haptenbindungstest

3.1.1. Prinzip

Der von Heymer (14) entwickelte und in einem Arbeitskreis des mikrobiologischen Instituts der IU München (33) modifizierte ^{125}J -Haptenbindungstest ist ein Radio-Immuno-Assay zur Bestimmung von Antikörpern gegen die Pentapeptid-Determinante des Peptidoglycans.

Die Antikörper im Patientenserum werden mit einer standardisierten Menge radioaktiv markiertem Pentapeptid (Antigen) inkubiert. Die hierbei entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexe werden ausgefällt und das nicht gebundene Antigen im Überstand durch Absaugen und Waschen entfernt. Die im Niederschlag gemessene Aktivität entspricht der Bindungskapazität eines Serums für das Pentapeptid.

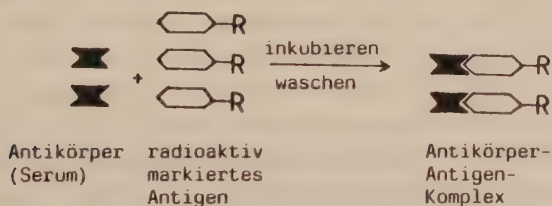


Abb. 2: Prinzip des ^{125}J -Haptenbindungstests

3.1.2. Markierung des Peptids mit N-Succinimidyl-3-(4-Hydroxy-5-¹²⁵J-Jodophenyl)-Propionat

Für die Überlassung des radioaktiv markierten Penta-peptids danke ich den Mitgliedern des Lehrstuhles für Mikrobiologie der TU München, die die Markierung durchführten. Näheres dazu kann aus der Dissertation von N. Franken (8) entnommen werden.

3.1.3. Durchführung des ¹²⁵J-Haptenbindungstests

Der Test wurde in Mikrofuge-Röhrchen (Fa. Beckmann) in Doppelansätzen durchgeführt. Lipämische Seren wurden vor dem Test in einer Eppendorffzentrifuge 5 Minuten zentrifugiert.

10 µl der zu messenden Serumprobe oder eines Kontrollserums wurden in ein Röhrchen pipettiert (Eppendorf-Pipette). Dazu wurden 10 µl der ¹²⁵J-Haptenlösung gegeben, deren Aktivität man durch Verdünnen mit fötalem Kälberserum (FCS) so eingestellt hatte, daß 10 µl Haptenlösung eine Aktivität von 30 000 cpm hatten. Danach wurden Serum und Antigen kurz gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde zur Ausfällung der Eiweiße 20 µl 80%ige Ammoniumsulfatlösung (4 °C) zugegeben und nach Schütteln die Probe 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die ausgefällten Immunglobuline wurden hierauf 5 Minuten abzentrifugiert (4 °C), der Überstand wurde mit einer an die Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteurpipette abgesaugt und der Niederschlag mit 20 µl 50%iger Ammoniumsulfatlösung (4 °C) gewaschen. Nach Schütteln und weiterem Zentrifugieren (5 Minuten, 4 °C) wurde die Waschflüssigkeit abgesaugt und die Radioaktivität des Sediments im Gamma-Zähler gemessen.

3.1.4. Testauswertung

Die in Prozent ausgedrückte Bindungskapazität der Seren wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Bindungskapazität} = \frac{\text{cpm der Serumprobe} \times 100}{\text{cpm der eingesetzten Gesamtradioaktivität}}$$

Die hierbei eingesetzte Gesamtradioaktivität (10 µl reiner Haptenlösung mit einer Radioaktivität von 30 000 cpm) entspricht einer Bindungskapazität von 100 %.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurden bei jeder Testreihe folgende Kontrollseren mitverwendet:

1. FCS (Fötales Kälberserum, das keine spezifischen Immunglobuline enthält) als Negativkontrolle,
2. ein Kontrollserum mit bekannter Bindungskapazität zu Beginn und am Ende der Meßreihe.

Bei Bindungskapazitäten der Seren über 50 % wurden Serumverdünnungsreihen in FCS angelegt und sogenannte Bindekurven erstellt, wie in Abschnitt 4.1.1. noch näher erläutert wird.

3.1.5. Präzision der Methode

Die "Präzision innerhalb einer Meßreihe" wurde durch die Bestimmung der Variationskoeffizienten V_k in drei verschiedenen Meßbereichen ermittelt. Dabei wurde ein niedrig-, ein mittel- und ein hochbindendes Serum im gleichen Ansatz je 10mal gemessen und dann V_k wie folgt berechnet:

$$V_k = \frac{\sigma \times 100}{\bar{x}}$$

$\bar{x}$: Mittelwert der Meßergebnisse
 σ : Standardabweichung

Der V_k	betrug bei einem Serum mit	10% Bindung	6,3%,
"	"	"	"
"	"	46% Bindung	1,6%,
"	"	"	"
"	"	84% Bindung	1,8%.

Aus diesen Werten ist zu erkennen, daß die Präzision im mittleren und hohen Meßbereich höher ist als im niedrigen.

Die "Präzision von Tag zu Tag" wurde anhand der Kontrollseren 040 (60% Bindung) und 2589 (78% Bindung) bestimmt, die bei jedem Testansatz mitgeführt wurden.

Der V_k betrug beim Serum 040 3,4%, beim Serum 2589 3,1 %.

Diese Variationskoeffizienten liegen gut in dem für klinisch-chemische Untersuchungen üblichen Bereich.

3.2. Der Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) zur Erfassung von IgG-Antikörpern gegen die Sequenz R-D-Ala-D-Ala

3.2.1. Prinzip

In dem von N. Franken entwickelten ELISA (8), einem sogenannten "Sandwich-Enzym-Immuno-Assay", binden spezifische Antikörper der Klasse IgG in der Serumprobe an ein immobilisiertes Antigen (Humanserumalbumin-(D-Ala₃)₉). Der gebildete Immunkomplex reagiert mit einem Antikörper gegen menschliches IgG, der mit Peroxidase markiert ist. Nach Entfernen des überschüssigen Anti-Antikörper-Enzym-Komplexes und Zugabe von Substrat kann die gebundene Enzymaktivität photometrisch bestimmt werden. Die

gemessene Aktivität ist dann proportional zur Konzentration an spezifischen Antikörpern im Serum.

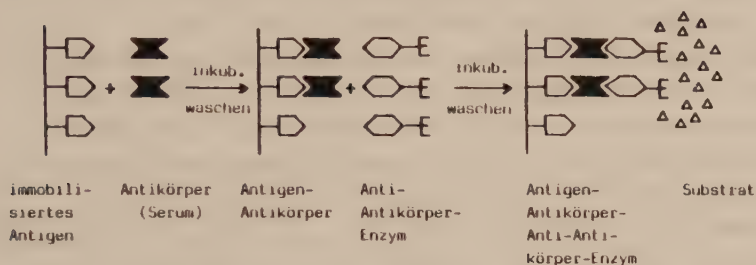


Abb. 3: Prinzip des ELISA

3.2.2. Synthese von Protein-Peptid-Konjugaten

Anstelle des C-terminalen Endes des Pentapeptids D-Ala₂ wurde das käufliche Tripeptid D-Ala₃ an HSA gekoppelt.

Für die Überlassung des Protein-Peptid-Konjugates HSA-(D-Ala₃)₉ danke ich Herrn N. Franken, der die Kopplung durchgeführt hat (8).

3.2.3. Durchführung des ELISA

Der Test wurde auf Mikrotiterplatten der Firma Greiner in Doppelansätzen durchgeführt.

Jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurde mit 25 ng HSA-(D-Ala₃)₉ bzw. HSA (Kontrolle) in 50 µl 0,1 M NaHCO₃ (Carbonatpuffer) beschichtet und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Trockenschrank).

Am nächsten Tag wurden von den vorher 5 Minuten lang zentrifugierten (Eppendorf-Zentrifuge) Seren, sowie vom Standardserum 004 Verdünnungsreihen (1:40, 1:80, 1:160, ..., 1:10240) angelegt (Verdünnung in PBS-T20).

Die beschichteten Platten wurden zunächst zweimal mit 100 µl PBS-T20 gewaschen, daraufhin wurden 50 µl jeder Serumverdünnung in die Vertiefungen pipettiert (Multi-pipette) und die Platte 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 100 µl PBS-T20 wurden 50 µl Enzym-Antikörper-Konjugat (Anti-Human-IgG konjugiert mit Peroxidase (Sigma, 29 U)) zugegeben, das im Verhältnis 1:1000 mit PBS-T20 verdünnt worden war. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde zur Entfernung des nicht gebundenen Konjugats wiederum zweimal mit 100 µl PBS-T20 gewaschen. Sodann wurden 200 µl Enzym-Substrat-Lösung (200 mg 1,2-Phenylendiamin und 6 µl H_2O_2 in 50 ml Phosphat-Citrat-Puffer (0,1 M, pH 5,0) zugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Die damit eingeleitete enzymatische Reaktion wurde nach 15 Minuten mit 50 µl 8 N H_2SO_4 gestoppt und die optische Dichte im Photometer bei 492 nm bestimmt.

3.2.4. Testauswertung und Quantifizierung

Für jede Serumverdünnung wurden mit dem Antigen HSA-(D-Ala₃)₉ wie auch mit der Kontrollsubstanz HSA jeweils Doppelwerte bestimmt. Die spezifische Antikörperbindung wurde ausgedrückt als Differenz ΔE der optischen Dichten, die bei der Versuchsdurchführung mit dem Antigen und mit der Kontrollsubstanz gemessen worden waren.

Bei jeder einzelnen Testreihe wurde eine Eichkurve mit dem Standardserum 004 mitgemessen. Für dieses Serum war von N. Franken mittels Affinitätschromatographie ein Gehalt an spezifischem IgG von 481 µg/ml bestimmt worden. Anhand des Serums 004 konnten die Meßergebnisse der Probandenserum quantifiziert werden. (Beispiele s. 4.1.2.)

3.2.5. Präzision der Methode

Drei Seren mit unterschiedlichem Gehalt an spezifischem IgG wurden in einer Versuchsreihe je 8 mal gemessen.

Der V_k	betrug bei einem Serum mit	345 $\mu\text{g/ml}$ spez. IgG	12,5%,
"	"	"	"
"	"	34 $\mu\text{g/ml}$	"
"	"	"	"
"	"	8 $\mu\text{g/ml}$	"
"	"	"	"
			11,2%,
			20,0%.

Die Präzision des ELISA ist somit zwar niedriger als in der klinischen Chemie normalerweise üblich, jedoch für eine immunologische Methode noch akzeptabel.

3.3. Bestimmung des Anti-Streptolysin-O-Titers (ASO)

Der ASO-Titer wurde mit einem Kit von Mast Diagnostica (Mast-Blue-ASO-Test FD303) bestimmt (21).

3.3.1. Prinzip

Die Titerbestimmung wurde nach dem Prinzip der indirekten Agglutination durchgeführt: Antigenträger sind Mikroorganismen (*Serratia marcescens*), die an ihrer Oberfläche mit Streptolysin O sensibilisiert sind. Enthält ein Probandenserum Antikörper gegen Streptolysin O, tritt eine Agglutination der Mikroorganismen auf.

3.3.2. Durchführung

Von den Probandenseren sowie von einem Kontrollserum wurden auf Mikrotiterplatten der Firma Greiner Verdünnungsreihen angelegt (1:20, 1:40, 1:80, ...; 25 μl pro Vertiefung). Dazu wurden 25 μl der Antigenlösung (Lösung von gefärbten, sensibilisierten *Serratia marcescens*) gegeben (ab Verdünnungsstufe 1:40 und höher). Zu der 1:20-

Verdünnung der Seren wurden 25 µl Kontrollantigen pipetiert (nicht sensibilisierte Serratia), um eventuelle unspezifische Bindungswerten im Serum zu erkennen. Um unspezifische Bindungen im Antigen bzw. Kontrollantigen zu erfassen, wurde je eine Vertiefung mit alleiniger Antigen- bzw. Kontrollantigenlösung beschichtet. Die Platte wurde geschüttelt und über Nacht erschütterungsfrei bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ablesung erfolgte am darauffolgenden Tag (18 - 24 Stunden nach dem Ansatz). Dabei wurde ein kompakter Knopf in der Mitte der Vertiefung als nicht reaktiv, eine membranartige Zellmatte als reaktiv angegeben. Der ASL-Titer drückt dann diejenige Verdünnung aus, bei der gerade noch eine Agglutination ablesbar war.

3.4. Bestimmung der Immunglobuline G und M

Die Bestimmung der Immunglobuline G und M erfolgte mit den FIAX-Test-Kits der Firma IDT (17).

3.4.1. Prinzip

Die FIAX-Test-Kits, sogenannte Fluoreszenz-Immunoassays, bedienen sich spezifischer Anti-Human-IgG- bzw.-IgM-Antikörper, die auf Teststäbchen an eine feste Phase gebunden sind. Mit diesen vereinigen sich die IgG- bzw. IgM-Antikörper aus dem Probandenserum zu Immunkomplexen. Die gebundenen Immunglobuline werden daraufhin mit einem fluoreszenzmarkierten Anti-Antikörper inkubiert. Die Intensität der Fluoreszenz an der festen Phase ist ein Maß für die Antikörperkonzentration im Serum.

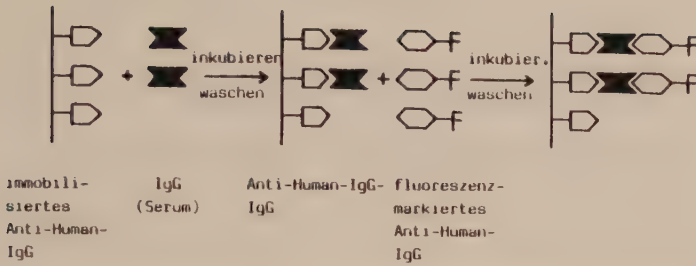


Abb. 4: Prinzip des Fluoreszenz-Immunoassays (Beispiel IgG)

3.4.2. Durchführung

Die Probandenserum wurden verdünnt (bei IgG 1:3750, bei IgM 1:250) und mit den Teststäbchen bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert (bei IgG 5 Minuten, bei IgM 15 Minuten). Nach der Reaktion wurden die Teststäbchen in 500 µl Waschpuffer gewaschen und mit 500 µl Fluoreszenz-Antikörper-Reagenz inkubiert (15 Minuten unter Schütteln). Nach einem weiteren Waschvorgang in 500 µl Puffer wurde die Intensität der Fluoreszenz jedes Stäbchens im FIAX Fluorometer gemessen.

Anhand von Standardserum wurde eine Eichkurve angelegt, aus der dann die Antikörperkonzentration der zu testenden Seren bestimmt werden konnte.

4. Ergebnisse

4.1. Beispiele für die Auswertung der Meßwerte

4.1.1. Bindekurven von Seren im ^{125}J -Haptenbindungstest

Wie oben erwähnt, wurden von allen Seren, die unverdünnt eine Bindungskapazität von mehr als 50% aufwiesen, Bindekurven angelegt.

Nach Verdünnung der Seren mit FCS im Verhältnis 1:2,5, 1:5, 1:10, 1:20 und 1:40 wurde der ^{125}J -Haptenbindungstest mit den einzelnen Verdünnungen durchgeführt. Die so ermittelten Bindungskapazitäten wurden auf halblogarithmischem Papier gegen die Verdünnungsstufe aufgetragen. Bei Verbindung der Punkte ergibt sich ein linearer Bereich, in dem die Meßgenauigkeit am größten ist.

Als Beispiele seien folgende Seren aufgeführt:

Kontrollserum 2589

Patientenseren von S.L., 52 J., w., Urosepsis

R.F., 77 J., m., Sepsis mit *Str. faecalis*

Z.K., 80 J., w., Sepsis mit *Klebs. pneumoniae*

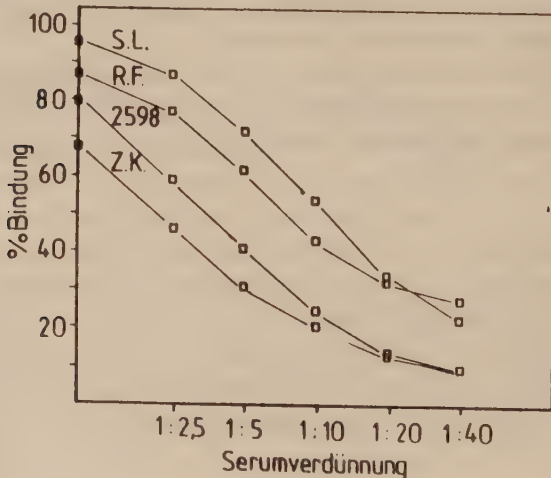


Abb. 5: Beispiele für Bindekurven im Haptenbindungstest

4.1.2. Bindekurven von Seren im ELISA und Quantifizierung

Im ELISA wurden von allen Seren Verdünnungsreihen und damit Bindekurven angelegt. Eine Ausnahme bildeten Seren, die schon in der Ausgangsverdünnung 1:40 sehr niedrige Extinktionswerte ($\Delta E < 0,3$) ergaben. Die übrigen Seren wurden je nach Höhe des Extinktionswertes der Ausgangsverdünnung bis maximal 1:10240 verdünnt. Die ΔE -Werte, die nach der in den Abschnitten 3.2.3. und 3.2.4. beschriebenen Methode ermittelt worden waren, wurden auf halb-logarithmischem Papier gegen die Verdünnung aufgetragen¹⁾. Dabei ergibt sich wie auch beim Haptenbindungstest in einem bestimmten Bereich eine Gerade. In diesem Bereich ist wiederum die Meßgenauigkeit am höchsten.

Die Bindekurve des Eichserums 004 wurde zusammen mit den Bindekurven der Probandenserien aufgetragen. Aus dem Vergleich der Kurven kann abgelesen werden, um wieviel mal höher das Eichserum verdünnt werden muß als das Probandenserum, um auf den gleichen ΔE -Wert zu kommen. Die Ablesung sollte möglichst im linearen Bereich beider Seren erfolgen.

In dieser Weise konnte anhand des Serums 004 (mit seinem bekannten Gehalt an spezifischem IgG von 481 $\mu\text{g/ml}$) auf den Gehalt an spezifischem IgG in den Probandenserien geschlossen werden.

Da im niedrigen Bereich eine gute Meßgenauigkeit nicht mehr gegeben ist (außerhalb des linearen Bereichs des Serums 004), wurden Seren mit einem Gehalt an spezifischen IgG von weniger als 5 $\mu\text{g/ml}$ nicht mit einem genauen Zahlenwert, sondern nur mit der Angabe $< 5 \mu\text{g/ml}$ gekennzeichnet. Auch eine weniger starke Ausgangsverdünnung dieser Seren (etwa 1:10 oder 1:20) hätte zu keiner Erhöhung der Meßgenauigkeit geführt, da der empfindliche Test durch zu konzentriertes Serum gestört wird.

1) Abb. 6 auf S. 23 bringt einige Beispiele.

Bei niedrigeren Verdünnungen als 1:40 zeigten sich meist eine überproportional starke Zunahme der unspezifischen Bindung, schlechtere Übereinstimmung der Doppelwerte, sowie eine schlechtere Reproduzierbarkeit der Meßwerte.

Wie man mit Hilfe der Bindkurven aus den gemessenen E-Werten die Konzentration an spezifischen Antikörpern berechnen kann, wird an den vier Beispielen der Abb. 6 (S. 23) gezeigt:

Patientenserum: R.F., 77 J., m., Sepsis mit Str. faecalis
linearer Bereich: z.B. bei $\Delta E = 0,8$
Verd. d. Eichserums: 1:1000
Verd. d. Patientenserums: 1: 740
 $1000 : 740 = 1,35$
 $481 \mu\text{g/ml} : 1,35 = \underline{356 \mu\text{g/ml}}$

R.F., s.o.
linearer Bereich: z.B. bei $\Delta E = 0,8$
Verd. d. Eichserums: 1:1000
Verd. d. Patientenserums: 1: 230
 $1000 : 230 = 4,35$
 $481 \mu\text{g/ml} : 4,35 = \underline{111 \mu\text{g/ml}}$

Z.J., 74 J., m., Sepsis mit Str. mitis
linearer Bereich: z.B. bei $\Delta E = 0,51$
Verd. d. Eichserums: 1:1800
Verd. d. Patientenserums: 1: 100
 $1800 : 100 = 18$
 $481 \mu\text{g/ml} : 18 = \underline{27 \mu\text{g/ml}}$

B.H., 74 J., w., Sepsis mit Str. pyogenes
linearer Bereich: z.B. bei $\Delta E = 0,19$
Verd. d. Eichserums: 1:4200
Verd. d. Patientenserums: 1: 40
 $4200 : 40 = 105$
 $481 \mu\text{g/ml} : 105 = \underline{4,5 \mu\text{g/ml}} (< \underline{5 \mu\text{g/ml}})$

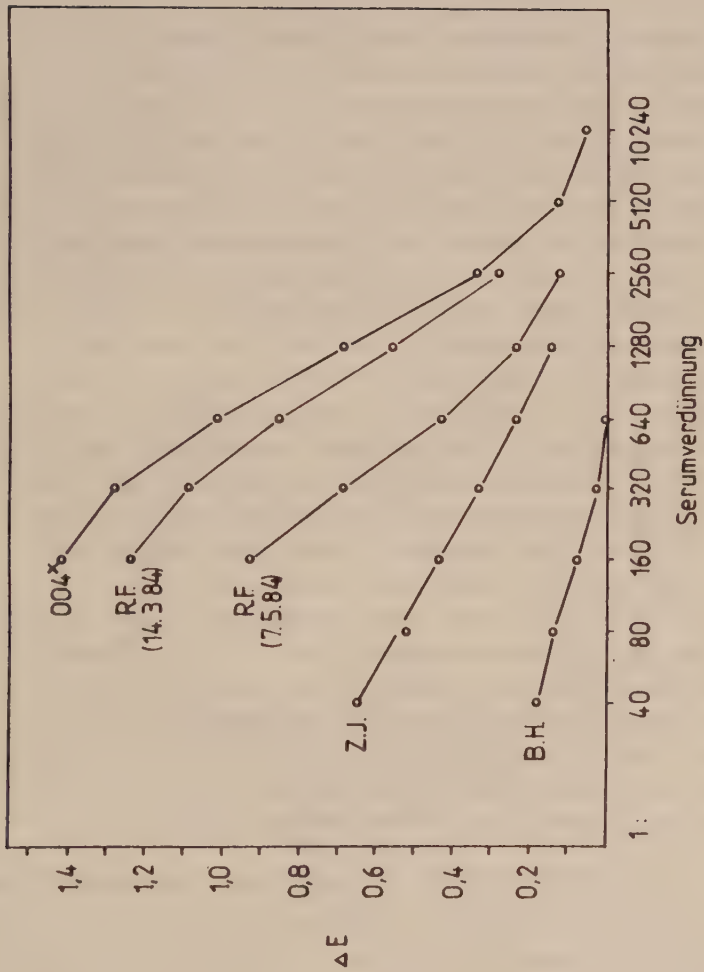


Abb. 6: Ausgewählte Bindekurven von Seren im ELISA

4.2. Ergebnisse der Messungen bei den "Langzeitpatienten"

Im Folgenden sind die Versuchsergebnisse von Patienten zugeordnet zu den einzelnen Erregertypen zusammengestellt. Zur Einführung wird für jeden Patienten ein kurzer Überblick über die Krankengeschichte gegeben, wobei auch die Anfangsbuchstaben von Familien- und Vornamen, das Geschlecht und das Alter angegeben sind.

Anschließend werden in einer Tabelle die Versuchsergebnisse des Haptenbindungstests und des ELISA, sowie der Bestimmungen des ASO-Titers und der Immunglobuline G und M zusammen mit den übrigen relevanten Daten dargestellt, soweit diese aus den Krankengeschichten entnommen werden konnten. Dabei werden unter anderem die Temperaturen angegeben, wenn sie 37,5 °C oder mehr betragen; typisch septische Temperaturen werden mit dem Zeichen $\uparrow$ hervorgehoben. Aus dem Differentialblutbild (Diff) sind nur die für bakterielle Infektionen wesentlichen segmentkernigen (Seg) und stabkernigen (Stab) Granulozyten angegeben. Als unspezifische Entzündungsparameter sind noch die BSG und der prozentuale Anteil der Gammaglobuline in der Serumelektrophorese aufgeführt.

Nach den Tabellen ist der zeitliche Verlauf der Bindungskapazität im Haptenbindungstest und der spezifischen Antikörperkonzentration im ELISA graphisch dargestellt. Der Tag, an dem die Septikämie in der Blutkultur nachgewiesen wurde, ist mit $\uparrow_{BK}$ markiert.

Zum Abschluß eines jeden Falles wird eine kurze, zusammenfassende Beschreibung der Ergebnisse gegeben.

4.2.1. Patientin E.A.

Bei der Patientin E.A., 81 Jahre, die wegen eines Apoplexes einen einmonatigen Krankenhausaufenthalt hatte, fand sich am 23.4.84 Staph. aureus in der Blutkultur. Sie hatte in der Klinik plötzlich sehr hohes Fieber bekommen. Ein Ursprungsort der Septikämie konnte nicht ausgemacht werden.

Datum	Temp.	BSG	Leuko	Diff	γ -Glob.	Bindung	spez. JgG	ASO	JgM	JgG
1984	°C		$10^3 \mu l^{-1}$	%	%	%	$\mu g/ml$	Titer	$\mu g/ml$	$\mu g/ml$
18.2.	38,0	99/128	10,8		17,3	53	< 5			
24.2.	<37,5	87/124	6,0			34	< 5		56	951
27.2.	39,0	85/125	13,9		16,9	53	< 5			
2.3.	<37,5		15,0			41	6			
7.3.	37,8	92/138	25,6	Seg 91, Stab 6	18,6	54	10			
9.3.	37,6		8,2	Seg 80	19,8	56	11			
13.3.	<37,5	91/134	7,7			72	14	< 1:320	134	1092
21.3.	<37,5	75/119	8,2	Seg 69	25,3	80	41			

Tab. 1: Werte bei der Patientin E.A.

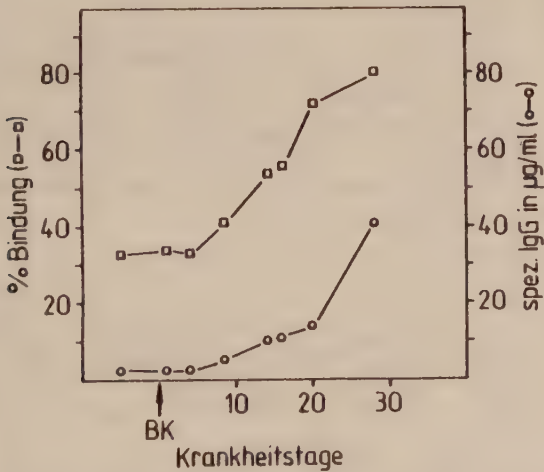


Abb. 7: Verlauf der Antikörperkonzentration bei der Patientin E.A.

Sowohl beim Haptenbindungstest als auch parallel dazu beim ELISA ist ein deutlicher Anstieg der Bindungskapazität nachweisbar.

4.2.2. Patientin H.I.

Über 2 Monate konnte die 53-jährige Patientin H.I. beobachtet werden. Sie war im Z.n. Keinhirnoperation zunächst auf einer neurologischen Station, kam aber nach der Diagnose einer bakteriellen Endokarditis auf dem Boden eines kombinierten Mitralvitiums auf eine innere Intensivstation. Die Patientin hatte wiederholt septische Mikroembolien in den Fingern. Am 29.4.84 konnte in der Blutkultur Staph. aureus als Erreger isoliert werden. Der klinische Verlauf war sehr protrahiert, trotz intensiver antibiotischer Therapie blieben die septischen Temperaturen über einen Monat lang bestehen.

Datum	Temp.	BSG	Leuko	Diff	γ -Glob.	Bindung	spez. JgG	ASO	JgM	JgG
1984	°C		$10^3 \mu l^{-1}$	%	%	%	$\mu g/ml$	Titer	$\mu g/ml$	$\mu g/ml$
26.4.	40,5	69/91	12,9	Seg81, Stab4	28,4	19	< 5	1:640	257	1440
2.5.	39,1		9,4			33	< 5			
4.5.	39,3		7,7			37	< 5			
7.5.	40,0		9,3			43	< 5			
11.5.	40,5		10,3			45	< 5			
14.5.	40,0	5/15	18,3	Seg72, Stab3	18,8	36	< 5	177	918	
17.5.	40,0		15,3			37	< 5			
1.6.	39,0		9,2			28	< 5			
5.6.	39,2					27	< 5			
13.6.	38,0					29	< 5			
26.6.	37,5		8,9			30	< 5			

Tab. 2: Werte bei der Patientin H.I.

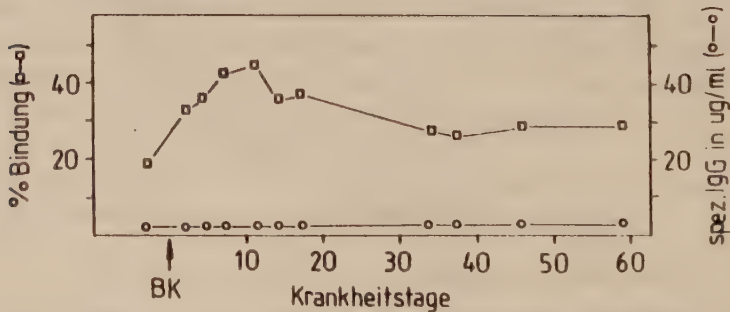


Abb. 2: Verlauf der Antikörperkonzentration bei der Patientin H.I.

Beim Haptenbindungstest findet sich innerhalb der ersten 12 Tage ein deutlicher Anstieg, beim ELISA keine Reaktion von spezifischem IgG.

4.2.3. Patient L.J.

Primär wegen kardiologischer Probleme (kombiniertes Mitralvitium, offenes Foramen ovale, Z. n. Herzinfarkt) war der 64-jährige L.J. anderthalb Monate lang Patient einer internen Intensivstation. Am 11.2.84 fand sich in einer Blutkultur Staph. aureus. Die Sepsis nahm wahrscheinlich von einem infizierten Venenkatheter ihren Ausgang. Am 19.3.84 wurde der Patient zum operativen Verschluß des Foramen ovale ins Deutsche Herzzentrum verlegt. Gegen Ende des Monats kam er nach Harlaching zurück.

Datum	Temp.	BSG	Leuko	Diff	γ -Glob.	Bindung	spez. JgG	ASO	JgM	JgG
1984	°C		$10^3 \mu\text{l}^{-1}$	%	%	%	$\mu\text{g/ml}$	Titer	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
10.2.	38,1	91/132	9,2	Seg 81	13,9	8	< 5			
15.2.	38,2		8,8		17,3	8	< 5			
20.2.	<37,5		9,0			8	< 5			
28.2.	<37,5	30/41	5,3	Seg 74	14,1	9	< 5	<1:320	154	811
7.3.	<37,5		6,9		15,2	8	< 5			
15.3.	<37,5	132/145	6,5			11	< 5			
29.3.	<37,5	72/111	13,5			29	15			

Tab. 3: Werte beim Patienten L.J.

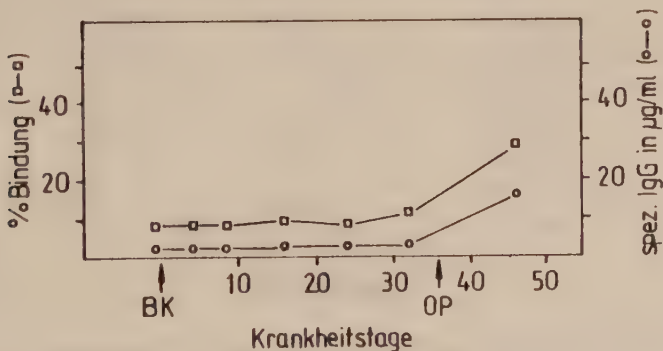


Abb. 9: Verlauf der Antikörperkonzentration beim Patienten L.J.

Bei beiden Testarten war einen Monat lang nur eine gleichbleibend niedrige Antikörperkonzentration feststellbar; erst nach der Herzoperation stieg die Antikörperkonzentration in beiden Testarten deutlich an.

4.2.4. Patient Ö.L.

Der 71-jährige Ö.L. war wegen einer schweren Bronchopneumonie mit akutem toxischem Nierenversagen auf der Intensivstation. Schon bei Aufnahme am 2.3.84 mit hohem Fieber wurde eine Blutkultur angelegt, aus der Staph. aureus isoliert wurde. Trotz eines relativ guten Ansprechens auf die antibiotische Therapie mit deutlicher Besserung der klinischen Symptomatik verstarb der Patient am 24.3.84.

Datum	Temp.	BSG	Leuko	Diff	γ -Glob.	Bindung	spez. JgG	ASO	JgM	JgG
1984	°C		$10^3 \mu l^{-1}$	%	%	%	$\mu g/ml$	Titer	$\mu g/ml$	$\mu g/ml$
5.3.	38,1		23,6	Seg88, Stab2	30,1	37	45			
8.3.	38,5	150/158	15,5			27	32			
12.3.	39,3		17,4		35,1	30	38			
15.3.	38,7		14,6			42	44			
19.3.	38,3		8,0			49	41	1:640	109	1220
22.3.	<37,5		13,0			51	48			

Tab. 4: Werte beim Patienten Ö.L.

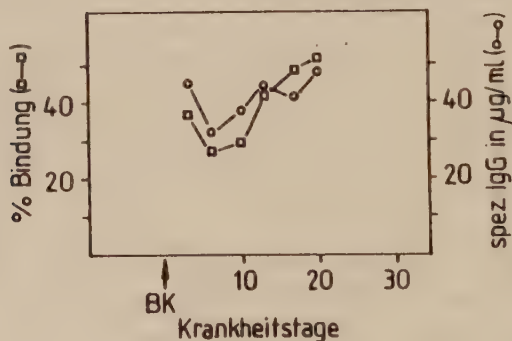


Abb. 10: Verlauf der Antikörperkonzentration beim Patienten Ö.L.

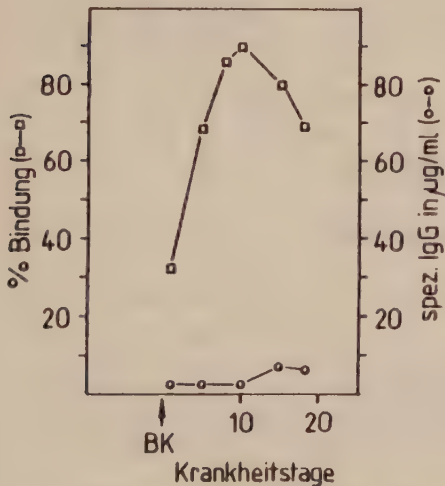
Die Kurven beider Tests verlaufen nahezu parallel: Nach kurzfristigem Abfall am Anfang (evtl. war der Patient bei der ersten Blutentnahme stark exsiccirt) ist ein deutlicher Anstieg der Bindungskapazität nachweisbar.

4.2.5. Patientin B.H.

Die 74-jährige Patientin B.H. zeigte das Bild eines schweren septischen Schocks mit disseminierter intravasaler Gerinnung und akutem toxischen Nierenversagen. Auf der Intensivstation erhielt sie zusätzlich zur antibiotischen Therapie noch größere Mengen an Immunglobulinen (Intraglobin) und Blutkonserven wegen des Trombozytenverbrauchs. Trotz anfänglicher Besserung verstarb die Patientin einen Monat nach dem Nachweis von Str. pyogenes in der Blutkultur.

Datum	Temp.	BSG	Leuko	Diff	δ -Glob.	Bindung	spez. JgG	ASO	JgM	JgG
1984	°C		$10^3 \mu l^{-1}$	%	%	%	$\mu g/ml$	Titer	$\mu g/ml$	$\mu g/ml$
7.5.	38,0 $\downarrow$	35/55	8,0	Seg67, St.31	11,2	32	< 5			
11.5.	39,7		20,9			69	< 5			
14.5.	37,8		28,5	Seg78, Stab7		86	< 5	1:2560	111	1533
16.5.	37,3		20,0			90	< 5			
21.5.	39,0 $\downarrow$		5,0	Seg84, Stab2	42,3	80	7			
24.5.	38,2		4,5			70	6			

Tab. 5: Werte bei der Patientin B.H.



Außerordentlich starker Anstieg beim Haptenbindungstest (vielleicht bedingt durch das i.v. verabreichte Immunglobulin, wodurch auch der in den folgenden 10 Tagen erfolgende teilweise Rückgang plausibel wäre). Fast konstant tief liegende ELISA-Werte.

Abb. 11: Verlauf der Antikörperkonzentration bei der Patientin B.H.

4.2.6. Patientin F.A.

Wahrscheinlich ausgehend von einem Erysipel am Arm entwickelte sich bei der 78-jährigen Patientin F.A. eine Septikämie mit dem β -hämolyisierenden Str. pyogenes. Differentialdiagnostisch stand noch eine bakterielle Endokarditis zur Debatte. Die Blutkultur war am 1.5.84 positiv.

Datum	Temp.	BSG	Leuko	Diff	γ -Glob.	Bindung	spez. JgG	ASO	JgM	JgG
1984	°C		$10^3 \mu l^{-1}$	%	%	%	$\mu g/ml$	Titer	$\mu g/ml$	$\mu g/ml$
3.5.	40,0	45/79	16,3	Seg 76, St. 13	23,1	23	< 5			
8.5.	38,1	149/154	12,0		25,6	34	< 5			
11.5.	37,6		11,0			46	< 5	< 1:520	80	1721
22.5.	< 37,5					48	< 5			

Tab. 6: Werte bei der Patientin F.A.

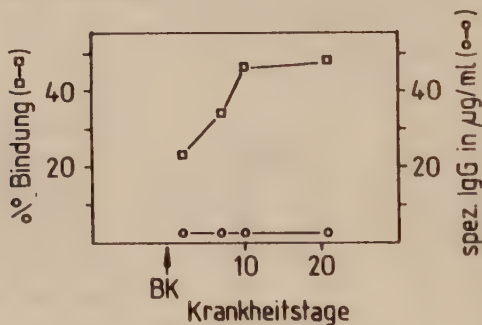


Abb. 12: Verlauf der Antikörperkonzentration bei der Patientin F.A.

Wie im ersten Fall von Septikämie mit Str. pyogenes (B.H., 4.3.5.) in den ersten 10 Tagen beim Haptenbindungstest signifikanter Anstieg, dann gleichbleibendes Niveau. Beim ELISA wiederum konstant tiefliegende Werte. Somit in beiden Fällen von Str. pyogenes-Sepsis entsprechende Reaktionen.

4.2.7. Patient A.W.

Der Patient A.W., 65 Jahre, befand sich wegen bakterieller Endokarditis auf dem Boden einer schweren Mitralinsuffizienz im Krankenhaus Harlaching. Am 24.4.84 wurde in der Blutkultur Str. mitis nachgewiesen.

Datum	Temp.	BSG	Leuko	Diff	γ -Glob.	Bindung	spez. JgG	ASO	JgM	JgG
1984	°C		$10^3 \mu l^{-1}$	%	%	%	$\mu g/ml$	Titel	$\mu g/ml$	$\mu g/ml$
7.5.	37,8	55/92	9,9		32,7	31	5			
17.5.	<37,5	87/125	7,4		32,7	26	< 5			
22.5.	<37,5	58/96				23	< 5	<1:320	113	1850
29.5.	<37,5	50/84	7,1		25,5	24	< 5			
2.7.	<37,5	18/43	7,4		25,0	13	< 5			

Tab. 7: Werte beim Patienten A.W.

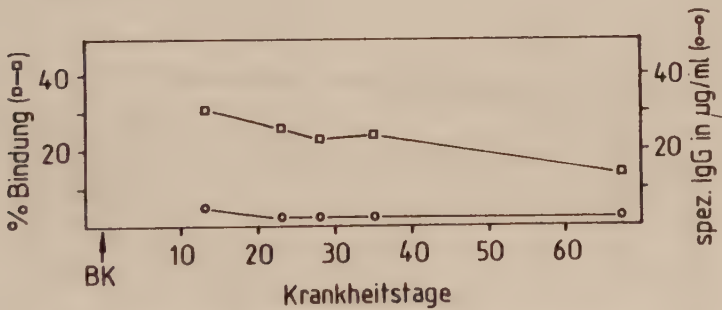


Abb. 13: Verlauf der Antikörperkonzentration beim Patienten A.W.

In den beiden Testarten ist kein Anstieg der Bindungskapazität zu beobachten; der Abfall beim Haptenbindungstest könnte allenfalls als ein Zeichen für eine vorausgegangene Immunreaktion gedeutet werden.

4.2.8. Patientin B.O.

Ebenfalls wegen Endokarditis mit vergrünenden Streptokokken lag die 70-jährige Patientin B.O. 8 Wochen lang stationär im Krankenhaus. Sie hatte über lange Zeit subfebrile Temperaturen und wiederholt septische Mikroembolien in den Fingern; ein großer Embolus im Arm mußte operativ entfernt werden. Am 20.1.84 konnte in einer Blutkultur Str. sanguis nachgewiesen werden.

Datum 1984	Temp. °C	BSG	Leuko $10^3 \mu l^{-1}$	Diff %	γ -Glob. %	Bindung %	spez. IgG $\mu g/ml$	ASO Titer	JgM $\mu g/ml$	JgG $\mu g/ml$
23.1.	37,6	110/115	13,0	Seg 88	13,7	10	34		94	903
6.2.	<37,5		8,0			12	34			
9.2.	<37,5	108/115	9,3	Seg 58		11	30	1:320		
13.2.	<37,5		3,8			12	23			
16.2.	39,5		4,0	Seg 59		11	20			
21.2.	<37,5		6,5	Seg 65		12	21			
1.3.	<37,5		4,1			12	24		89	1075
6.3.	<37,5					12	21			
8.3.	<37,5		4,9			15	34			
15.3.	<37,5		4,3	Seg 68		10	25			

Tab. 8: Werte bei der Patientin B.O.

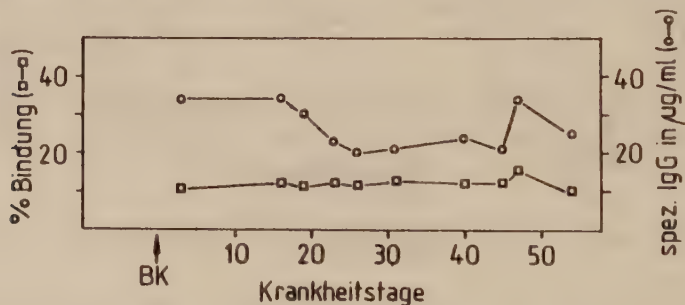


Abb. 14: Verlauf der Antikörperkonzentration bei der Patientin B.O.

Wie beim vorrausgehenden Patienten A.W. mit vergrünenden Streptokokken bei beiden Testarten kein durchgehender Anstieg; im Gegensatz zum vorrausgehenden und zum folgenden 3. Patienten mit dieser Keimart beim ELISA eine relativ hohe Konzentration an spezifischem IgG.

4.2.9. Patient S.H.

Wegen eines cerebralen Insultes befand sich der 77-jährige S.H. auf einer internistischen Station. Da er ständig subfebrile Temperaturen und ein Herzgeräusch hatte, ergab sich der Verdacht auf eine subakute Endokarditis. Nach wiederholten vergeblichen Versuchen, den Erreger nachzuweisen, fand sich am 25.2.84 Str. salivarius in einer Blutkultur.

Datum 1984	Temp. °C	BSG	Leuko $10^3 \mu l^{-1}$	Diff %	γ -Glob. %	Bindung %	spez.JgG $\mu g/ml$	ASO liter	JgM $\mu g/ml$	JgG $\mu g/ml$
28.2.	37,8	70/111	6,0		18,3	25	6	<1:320		
29.2.	<37,5					26	5			
19.3.	<37,5	45/77				29	7		111	1325
26.3.	<37,5	20/46				30	6			

Tab. 9: Werte beim Patienten S.H.

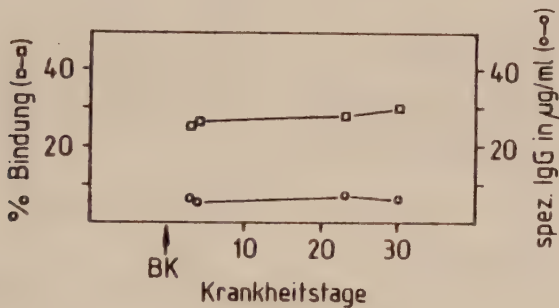


Abb. 15: Verlauf der Antikörperkonzentration beim Patienten S.H.

In beiden Testarten keine Änderung der Bindungskapazität, somit ähnlicher Verlauf wie beim Patienten A.W. (4.3.7.)

4.2.10. Patient R.F.

Auf dem Boden eines schweren chronischen Harnwegsinfektes erlebte der 77-jährige R.F. innerhalb von 3 Monaten wiederholte Ausbrüche einer Enterokokken-Septikämie. Str. faecalis wurde insgesamt dreimal (am 2.3., 30.4. und 11.5.84) in Blutkulturen nachgewiesen. Jedes Mal sprach der Patient gut auf die antibiotische Therapie an, doch einige Zeit darauf kam die Infektion wieder zum Ausbruch. Erst ca. 3 Monate nach der ersten Sepsis konnte er endgültig entlassen werden.

Datum	Temp.	BSG	Leuko	Diff	γ -Glob.	Bindung	spez. IgG	ASO	IgM	IgG
1984	°C		$10^3 \mu l^{-1}$	%	%	%	$\mu g/ml$	Titel	$\mu g/ml$	$\mu g/ml$
5.3.	<37,5	107/129	15,5	Seg 89		86	345			
14.3.	<37,5	47/60	13,4			86	356			
16.3.	<37,5				12,2	83	311	<1:320	104	800
2.5.	39,5	65/99	18,1	Seg 88, Stab 2	12,0	80	140			
7.5.	<37,5	40/70	17,4			71	111			
10.5.	<37,5					72	110			
11.5.	38,5		9,7			71	118			
14.5.	<37,5	58/108	20,8	Seg 64		74	128			
28.5.	<37,5	69/109	11,5			79	181			
7.6.	39,0	67/95	17,7	Seg 89		84	171			

Tab. 10: Werte beim Patienten R.F.

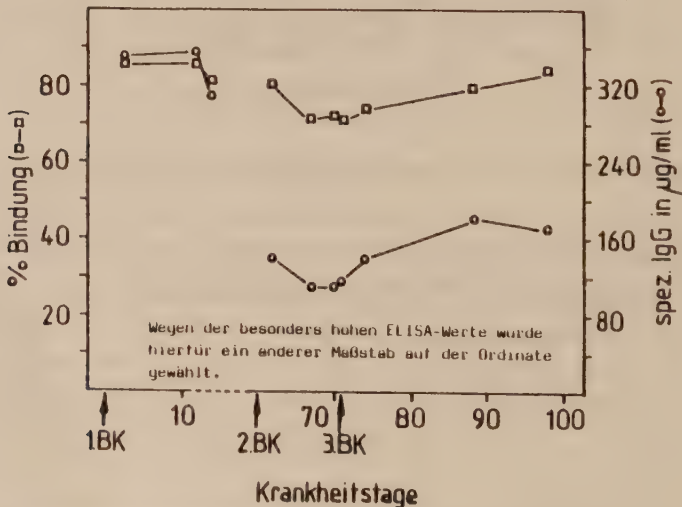


Abb. 16: Verlauf der Antikörperkonzentration beim Patienten R.F.

Die extrem hohen Werte bei beiden Testarten sind wohl dadurch zu erklären, daß der Patient während der gesamten Beobachtungsdauer und sicher auch schon längere Zeit vorher eine schwere Enterokokken-Infektion hatte. Für beide Testarten zeigen die Kurven einen ähnlichen Verlauf. Für die Tatsache, daß bei der ersten Sepsis die ELISA-Werte noch wesentlich höher lagen als bei den Untersuchungen der zweiten und dritten Blukultur, ist keine eindeutige Ursache erkennbar.

4.2.11. Patientin W.I.

Als nächste soll die 81-jährige W.I. aufgeführt werden, die mit einer lange therapieresistenten E. Coli-Sepsis auf dem Boden einer massiven Nierenstauung wegen Harnleiterkonkrement in stationärer Behandlung war. Die Keime wurden am 20. 1.84 in der Blutkultur nachgewiesen, als die Patientin mit hohem Fieber und Schüttelfrost in die Klinik eingewiesen wurde. Erst nach über einem Monat besserte sich ihr Zustand soweit, daß sie entlassen werden konnte.

Datum	Temp.	BSG	Leuko	Diff	γ -Glob.	Bindung	spez. JgG	ASO	JgM	JgG
1984	°C		$10^3 \mu l^{-1}$	%	%	%	$\mu g/ml$	· Liter	$\mu g/ml$	$\mu g/ml$
25.1.	39,0	50/82	18,3	Seg 89	20,4	10	< 5			
1.2.	38,0	110/128	40,8	Seg 93	23,4	12	< 5			
6.2.	38,2					12	< 5	1:320	59	1330
9.2.	38,5		13,7	Seg 85		15	< 5			
15.2.	37,5		11,0			11	< 5			
20.2.	39,8	75/114	14,0	Seg 74	16,0	10	< 5			
29.2.	<37,5					11	< 5			

Tab. 11: Werte bei der Patientin W.I.

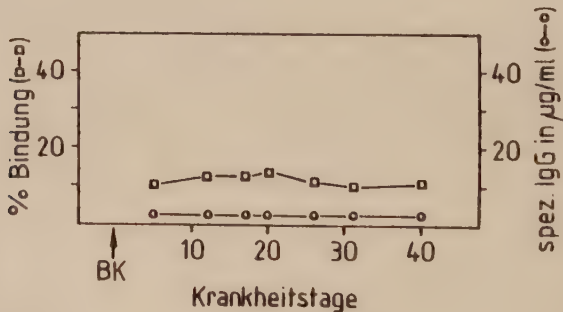


Abb. 17: Verlauf der Antikörperkonzentration bei der Patientin W.I.

Bei beiden Testarten wie erwartet (da gramnegative Sepsis) gleichbleibend niedrige Antikörperkonzentration.

4.2.12. Patient D.W.

D.W., ein männlicher Patient von 74 Jahren, lag wegen eines frontobasalen Hirninfarktes mit organischem Psychosyndrom auf einer neurologischen Station. Wahrscheinlich auf dem Boden eines massiven respiratorischen Infekts entwickelte sich eine gramnegative Sepsis. Am 21.2.84 konnte Klebs. pneumoniae in der Blutkultur nachgewiesen werden.

Datum	Temp.	BSG	Leuko	Diff	γ -Glob.	Bindung	spez. JgG	ASO	JgM	JgG
1984	°C		$10^3 \mu l^{-1}$	%	%	%	$\mu g/ml$	Titer	$\mu g/ml$	$\mu g/ml$
24.2.	<37,5	40/72	19,6	Seg 76	12,8	25	50			
29.2.	<37,5	55/91				27	41			
7.3.	<37,5	50/73	11,0			26	39			
9.3.	<37,5					24	32			
26.3.	<37,5					33	32	<1:320	89	619
14.4.	<37,5	80/102			14,8	55	65			

Tab. 12: Werte beim Patienten D.W.

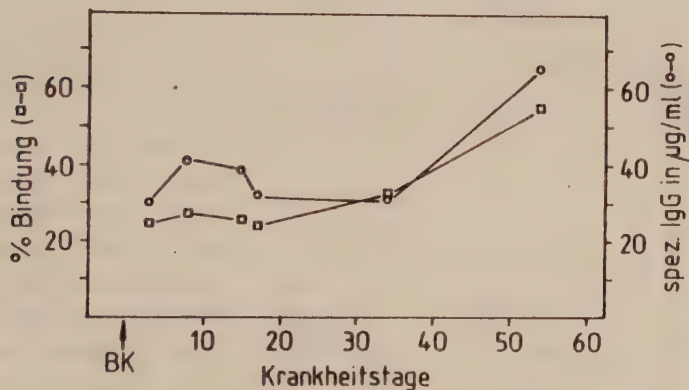


Abb. 18: Verlauf der Antikörperkonzentration beim Patienten D.W.

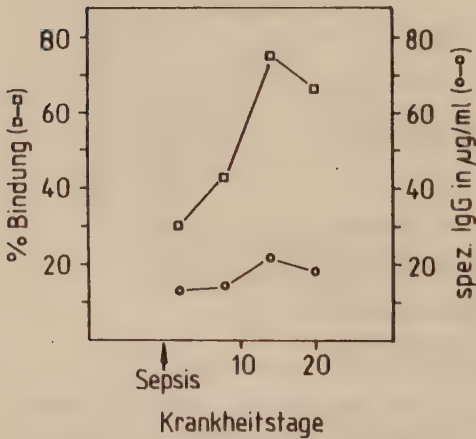
Es ist überraschend, daß beim Patienten D.W. (wie übrigens auch bei dreien der vier weiteren Patienten mit Klebsiellensepsis, vergl. Tab. 14, Abschnitt 4.3.) relativ hohe Antikörperkonzentrationen auftreten. Beim hier besprochenen Patienten D.W. ist sogar ein Anstieg der Bindungskapazität zu verzeichnen. Da diese Erscheinung in beiden Testarten auftritt, kommen Meßfehler wohl nicht in Frage.

4.2.13. Patientin S.M.

Die 74-jährige Patientin S.M. schließlich kam am 15.2.84 mit sehr hohem Fieber und starkem Schüttelfrost ins Krankenhaus. Bei der Untersuchung wurde eine Pneumonie mit septischem Verlauf diagnostiziert. Aus der Blutkultur konnte aber kein Keim isoliert werden. Trotzdem sprach der klinische Verlauf so sehr für das Vorliegen einer Septikämie, daß die Patientin ins Kollektiv aufgenommen wurde.

Datum	Temp.	BSG	Leuko	Diff	γ -Glob.	Bindung	spez. JgG	ASO	JgM	JgG
1984	°C		$10^3 \mu\text{l}^{-1}$	%	%	%	$\mu\text{g/ml}$	liter	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
17.2.	37,5	17/35	8,1	Seg 91	15,6	30	13			
23.2.	38,2		8,9			44	14			
29.2.	<37,5		8,0			75	22	<1:320	161	1075
6.3.	<37,5		5,8			66	18			

Tab. 13: Werte bei der Patientin S.M.



Die Werte beim Haptenbindungstest steigen auf ein unerwartet hohes Niveau an. Die ELISA-Werte liegen zwar relativ niedrig, machen diese Bewegung aber deutlich mit.

Abb. 19: Verlauf der Antikörperkonzentration bei der Patientin S.M.

4.3. Ergebnisse der Messungen bei den übrigen Patienten

Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefaßt, aus der folgende Daten ersichtlich sind: Anfangsbuchstaben, Geschlecht und Alter der Patienten, die Diagnose, das Datum der Blutkultur, klinische und laborchemische Befunde (Temperaturen, Leukozytenzahlen, Differentialblutbild und Gammaglobuline), sowie die Bindungskapazität (in %) im Haptenbindungstest und die Konzentration an spezifischem IgG im ELISA ($\mu\text{g/ml}$ spez. IgG).

Nr.	Patient	Diagnose	Datum 1984	Temp. °C	Leuko $\frac{10^3}{\mu l}$	Diff. blutbild %	β -Glob. %	Bindung %	spez. IgG $\mu g/ml$
1.	B.I., w., 86J.	Staph.-aureus-Septikämie am 18.2.84	18.2. 23.2.	39,5 <37,5	13,1 9,5	Seg 77, Stab 1	20,0	23 25	18 17
2.	L.A., m., 44J.	Staph.-aureus-septikämie am 27.2.84	27.2. 9.3.	40,5 <37,5	6,2 7,1		13,5	38 44	11 11
3.	M.J., m., 79J.	Staph.-aureus-Septikämie am 26.1.84 (infizierter Venenkatheter)	7.2. 14.2.	38,5 <37,5	16,2	Seg 87	17,0	85 87	48 43
4.	R.K., m., 77J.	Staph.-aureus-Septikämie am 2.2.84 (Shunt-Infektion)	3.2. 10.2. 14.2. 8.3.	37,6 <37,5 <37,5 <37,5	5,5 13,1	Seg 89 Seg 71, Stab 3	20,0	58 78 63 60	39 120 44 34
5.	S.L., m., 71J.	Staph.-aureus-Septikämie am 23.5.84 (infizierter Venenkatheter)	25.5. 4.6. 22.6.	39,0 38,3 <37,5	28,9 14,8 8,3	Seg 81, Stab 4	27,0	24 28 29	< 5 < 5 < 5
6.	A.H., w., 33J.	Endokarditis m. Str. sanguis BK positiv am 2.3.84	6.3. 14.3.	39,8 36,5	13,3 6,6	Seg 73, Stab 12	14,3	17 18	< 5 < 5
7.	D.J., m., 65J.	Str.-mitis-Septikämie am 24.2.84	5.3.	<37,5	12,7		20,6	14	< 5
8.	H.K., w., 70J.	Str.-sanguis-Septikämie am 28.5.84	29.5.	36,0	4,5		10,2	12	< 5

Tab. 14: Werte der übrigen Patienten

Nr.	Patient	Diagnose	Datum 1984	Temp. °C	Leuko $10^3 \mu l^{-1}$	Diff. blutbild %	μ -Glob. %	Bindung %	spez. IgG $\mu g/ml$
9.	H.A., w., 83J.	Endokarditis m. Str. bovis BK positiv am 30.5.84	1.6. 13.6. 27.6.	38,5 <37,5 <37,5	7,6 8,6 7,6	Seg 78	22,4 21,0 14,6	35 33 28	< 5 < 5 < 5
10.	O.I., w., 25J.	Str.-mitis-Septikämie am 6.5.84	9.5.	<37,5	15,0	Seg 82	18,0	70	26
11.	R.M., w., 89J.	Str.-sanguis-Septikämie am 26.2.84 (Harnwegsinfekt)	27.2. 12.3.	38,5	12,8 5,5	Seg 90, Stab 2	20,9	5 6	< 5 < 5
12.	M.A., w., 78J.	Endokarditis m. Str. bovis BK positiv am 5.3.84	14.3. 26.3. 17.4.	37,6 38,0 37,8	6,5 6,8 7,6	Seg 77, Stab 1	26,3	11 14 9	< 5 < 5 < 5
13.	Z.J., m., 74J.	Str.-mitis-Septikämie am 11.2.84 (Cholezystitis)	13.2.	38,5	6,9		17,7	23	27
14.	G.W., m., 81J.	B-Streptokokken-Septikämie am 4.2.84 (Shunt-Infekt)	6.2. 9.2.	37,5 38,8	15,7 12,9	Seg 71, Stab 13	11,3	9 8	8 < 5
15.	S.G., m., 42J.	C-Streptokokken-Septikämie am 1.3.84	5.3. 14.3. 16.4.	39,6 39,5 <37,5	21,1 24,5 10,2		17,7	50 46 43	< 5 < 5 < 5
16.	G.R., m., 79J.	Pneumokokken-Septikämie am 25.5.84 (Pneumonie)	28.5.	<37,5	16,0			16	< 5

Tab. 14: Werte der übrigen Patienten (Fortsetzung)

Nr.	Patient	Diagnose	Datum 1984	Temp. °C	Leuko $10^3 \mu l^{-1}$	Diff.blutbild %	p-Glob. %	Bindung %	spez. IgG $\mu g/ml$
17.	K.E., m., 54J.	Pneumokokken-Septikämie am 28.2.85 (Douglas-Abszess) system. Lupus Erythematodes	29.2. 19.3. 2.4.	<37,5 <37,5 <37,5	10,6 3,7	Seg 71, Stab 22	39,9	11	< 5
18.	N.H., w., 55J.	Pneumokokken-Septikämie am 21.3.84 (Bronchial-Ca.)	26.3.	<37,5	17,5		19,4	11	< 5
19.	I.M., w., 75J.	Pneumokokken-Septikämie am 14.5.84 (Pneumonie)	25.5. 18.6.	39,0 <37,5	13,5 5,1	Seg 82, Stab 2	15,1	21 17	< 5 < 5
20.	S.J., m., 75J.	Septikämie und Perikarditis mit Corynebakt. am 19.4.84	4.5. 15.4.	<37,5 <37,5	12,4 9,7	Seg 74	22,7 17,2	50 43	12 10
21.	B.A., w., 58J.	E.-Coli-Septikämie am 12.6.84 (Shunt-Infektion)	14.6. 18.6. 4.7.	40,0 <37,5 <37,5	28,6 10,8 15,1	Seg 92, Stab 3 Seg 90 Seg 86	13,1 12,6	59 71 67	< 5 < 5 < 5
22.	E.K., w., 74J.	E.-Coli-Septikämie am 2.2.84 (Harnwegsinfekt)	3.2. 17.2. 13.3.	40,0 <37,5 <37,5	48,1 8,7 7,8	Seg 67, Stab 27	19,1 22,4 23,6	12 13 10	< 5 < 5 < 5
23.	F.M., w., 76J.	E.-Coli-Septikämie am 3.6.84 (Harnwegsinfekt)	13.6.	<37,5	10,3		16,9	44	30
24.	G.S., m., 73J.	E.-Coli-Septikämie am 6.5.84 (Cholezystitis)	14.5.	<37,5	8,5		19,3	28	12

Tab. 14: Werte der übrigen Patienten (Fortsetzung)

Nr.	Patient	Diagnose	Datum 1984	Temp. °C	Leuko $10^3 \mu l^{-1}$	Diff. blutbild %	γ -Glob. %	Bindung %	spez. IgG $\mu g/ml$
25.	H.W., w., 70J.	E.-Coli-Septikämie am 18.5.84 (Harnwegsinfekt)	25.5.	<37,5	9,8		19,1	13	< 5
26.	H.B., w., 82J.	E.-Coli-Septikämie am 7.2.84	16.2.	<37,5	13,7		20,5	37	< 5
27.	J.M., w., 67J.	E.-Coli-Septikämie am 3.2.84 (Harnwegsinfekt)	10.2. 1.3.	<37,5 38,0	12,5 12,9		16,0	52 55	< 5 < 5
28.	M.M., w., 83J.	E.-Coli-Septikämie am 8.3.84 (Papillen-Ca.)	29.2. 19.3. 24.4.	<37,5 <37,5 <37,5	10,6 6,6	Seg 73	17,1 17,7	18 16 14	< 5 < 5 < 5
29.	M.A., w., 87J.	E.-Coli-Septikämie am 19.3.84 (Cholezystitis)	3.4.	39,0	9,8	Seg 69, Stab 5	29,3	36	14
30.	P.O., w., 86J.	E.-Coli-Septikämie am 1.3.84 (Harnwegsinfekt)	8.3.	<37,5	8,9	Seg 66	22,0	31	8
31.	S.M., w., 72J.	E.-Coli-Septikämie am 6.2.84 (Harnwegsinfekt)	14.2.	38,0	5,3		19,4	16	< 5
32.	V.M., w., 74J.	E.-Coli-Septikämie am 21.2.84 (Cholezystitis)	23.2.	<37,5	9,5	Seg 79, Stab 1	21,1	11	8
33.	L.H., w., 76J.	Klebsiellen-Septikämie am 21.2.84 (Harnwegsinfekt)	28.2.	38,1	9,5	Seg 66	19,6	54	29

Tab. 14: Werte der übrigen Patienten (Fortsetzung)

Nr.	Patient	Diagnose	Datum 1984	Temp. °C	Leuko $10^3 \mu l^{-1}$	Diff.blutbild %	p-Glob. %	Bindung %	spez. IgG $\mu g/ml$
34.	S.J., w., 76J.	Klebsiellen-Septikämie am 31.1.84 (Dekubitus)	14.2.	<37,5	5,6	Seg 70, Stab 1	20,0	13	13
35.	M.N., m., 70J.	Klebsiellen-Septikämie am 19.5.84 (Rectumfistel)	21.5. 25.5.	<37,5 <37,5	23,2 14,6	Seg 81	11,3	46 57	31 46
36.	Z.K., w., 80J.	Klebsiellen-Septikämie am 5.3.84	13.3.	38,2	15,6	Seg 78, Stab 15	18,2	67	7
37.	A.F., m., 63J.	Enterobacter-Septikämie am 28.2.84	7.3.	<37,5	6,0		12,4	34	10
38.	C.G., m., 61J.	Proteus-mirabilis- Septikämie am 10.2.84	13.2. 22.2.	37,6 <37,5	3,3	Seg 69, Stab 3	11,7	24 26	18 21
39.	P.J., m., 75J.	Urosepsis am 6.2.84 BK negativ (Harnwegsinfekt)	8.2. 20.2. 27.2.	38,2 37,6 37,8	13,3 15,2 11,2	Seg 80, Stab 8 Seg 90	15,6 21,8	62 72 67	20 29 45
40.	S.L., w., 52J.	Urosepsis am 29.2.84 BK negativ (Harnwegsinfekt)	1.3. 7.3.	40,8 <37,5	10,2 9,3		23,6	96 94	410 324
41.	M.V., m., 81J.	Sepsis am 8.6.84 BK negativ (Pneumonie)	18.6. 20.6.	<37,5 <37,5	7,0 9,6	Seg 69	26,0	83 85	52 38

Tab. 14: Werte der übrigen Patienten (Schluß)

4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse bei allen Patienten

Zwei zusammenfassende Graphiken sollen die Meßergebnisse nochmals verdeutlichen. Die Patienten sind hierbei wieder nach den in der Blutkultur isolierten Keimen in Gruppen unterteilt. Wenn bei Patienten mehrere Serumproben auf ihren Gehalt an spezifischen Antikörpern untersucht wurden, ist in der Graphik jeweils der höchste gemessene Wert angegeben (Abb. 20 und 21).

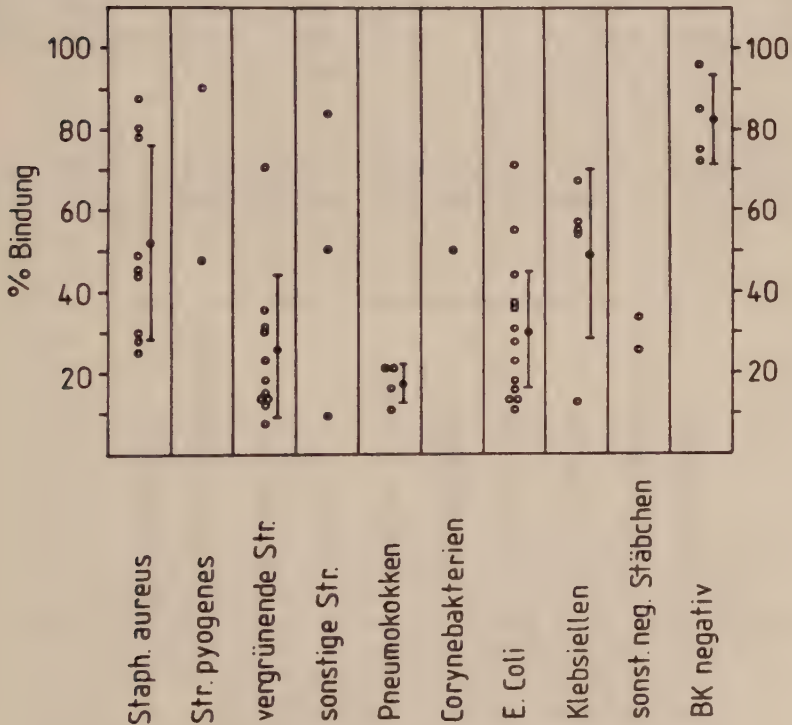


Abb. 20: Verteilung der Antikörperspiegel bei den verschiedenen Keimen im Haptenbindungstest

($\bullet$ gibt Mittelwert und Standardabweichung an)

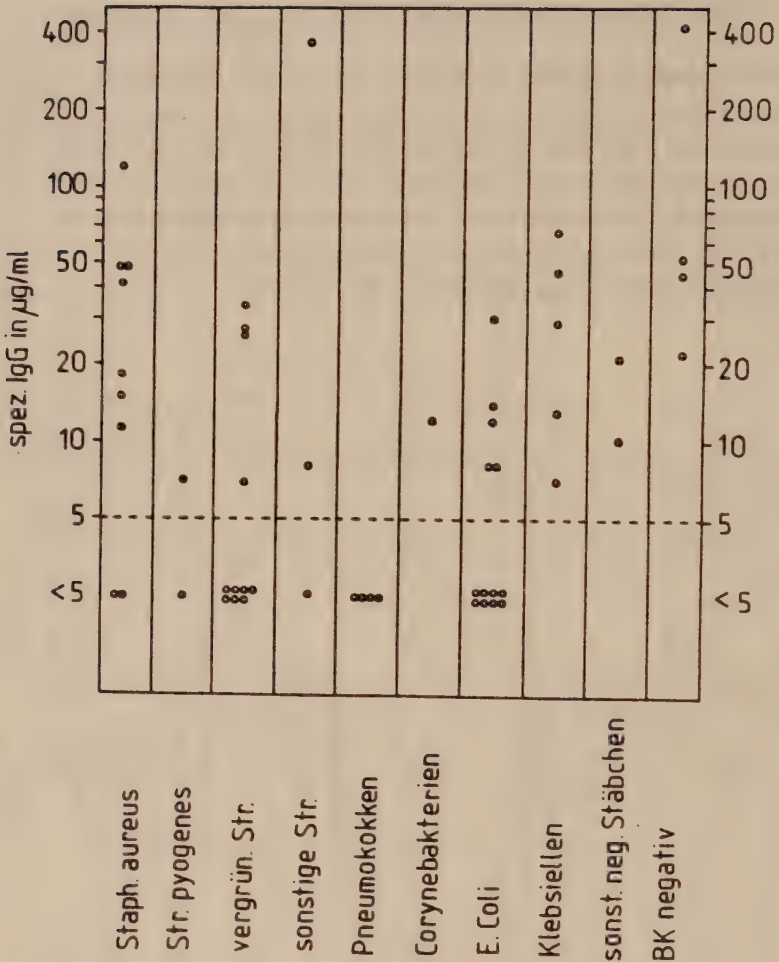


Abb. 21: Verteilung der Antikörperspiegel (spez. IgG) bei den verschiedenen Keimen im ELISA (wegen der hohen Differenzen werden die Meßwerte auf halb-logarithmischem Papier aufgetragen)
Werte unter 5 µg/ml liegen nicht mehr im Bereich der Meßgenauigkeit und können nur als < 5 µg/ml angegeben werden.

Für Septikämien mit Keimen, bei denen vier oder mehr Patienten (n) zur Verfügung standen, wurden über die entsprechende Patientengruppe Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichung (σ_{n-1}) der höchsten Meßergebnisse jedes einzelnen Patienten im Haptenbindungstest und im ELISA berechnet.

Septikämie	n	Haptenbindungstest		ELISA	
		$\bar{x}$	σ_{n-1}	$\bar{x}$	σ_{n-1}
Staph. aureus	9	52%	24	34 µg/ml	37
vergr. Str.	11	26%	18	10 µg/ml	12
Pneumokokken	4	17%	5	< 5 µg/ml	-
E. Coli	13	30%	14	7 µg/ml	8
Klebsiellen	5	49%	21	32 µg/ml	24
neg. BK	4	82%	11	132 µg/ml	185 ¹⁾

Tab. 15: Mittelwert und Standardabweichung der Bindungskapazitäten der Seren von den Patienten mit den am häufigsten vorkommenden Erregern

1) Wegen der extrem hohen Streuung der Meßwerte sind hier Mittelwert und Standardabweichung nicht sehr aussagekräftig.

4.5. Vergleich der Serumbindung im Haptenbindungstest und im ELISA

Für den Vergleich wurde von jedem der 54 Patienten das am höchsten bindende Serum ausgewählt. Diese Seren werden in der folgenden Tabelle sowohl nach der Bindungskapazität beim Haptenbindungstest als auch nach der Antikörperkonzentration beim ELISA aufgegliedert. Dabei wurden für beide Tests jeweils Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Bindungskapazität gebildet.

		Fallzahlen aufgegliedert nach Bindungskapazität im Haptenbindungstest			
		< 24%	24 - 54%	55 - 100%	zusam.
Aufgliederung nach Antikörperkonzentration beim ELISA	< 10 µg/ml	16	10	3	29
	10-50 µg/ml	3	11	6	20
	> 50 µg/ml	0	0	5	5
	zusammen	19	21	14	54

Tab. 16: Aufgliederung von 54 Seren nach Bindungskapazität im Haptenbindungstest und im ELISA zur Untersuchung der Korrelation zwischen beiden Testarten

32 Seren (das sind 59%) liegen bei beiden Testsystemen im gleichen Bereich (16 jeweils im niedrigen, 11 jeweils im mittleren und 5 jeweils im hohen Bereich). 19 Seren (das sind 35%) weisen im ELISA gegenüber dem Haptenbindungstest niedrigere Werte auf. 3 Seren oder 6% zeigen hingegen im Haptenbindungstest niedrige Bindung gegenüber mittlerer Bindung im ELISA. Hohe Bindungen beim ELISA traten nur auf, wenn auch die Werte beim Haptenbindungstest im hohen Bereich lagen. In der Diskussion wird eine mögliche Erklärung hierfür gegeben.

5. Diskussion

5.1. Zu den beiden Testarten

Ziel der Arbeit war es nachzuweisen, ob Patienten mit septisch verlaufenden Erkrankungen Antikörper gegen das Peptidoglycan der Zellwand grampositiver Bakterien bilden, und zu überprüfen, inwieweit die Messung dieser Antikörper diagnostisch von Bedeutung sein kann.

Hierbei wurden zwei unterschiedliche Testsysteme verwendet, ein Haptenbindungstest (RIA) und ein Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA). Bevor nun die Ergebnisse der Versuche im einzelnen diskutiert werden, ist es nötig, ein paar Überlegungen über die grundsätzlichen Unterschiede in den beiden Testsystemen anzustellen. Dies soll zeigen, inwieweit die Ergebnisse der beiden Methoden überhaupt miteinander vergleichbar sind.

Bei Anwendung des ^{125}J -Haptenbindungstests wurde der Gehalt an Antikörpern in einem Probandenserum als Bindungskapazität in Prozent der der eingesetzten Gesamtantigenmenge angegeben. Die Werte sind aber nicht als linear anzusehen, vielmehr entsprechen 10% Unterschied in der Bindungskapazität zweier Seren einem tatsächlichen Unterschied in der Antikörperkonzentration um den Faktor 10, 20% um den Faktor 100 usw.

Mit dem ELISA konnte der Gehalt eines Serums an spezifischen Antikörpern direkt in $\mu\text{g/ml}$ angegeben werden.

Die beiden Testsysteme unterscheiden sich wesentlich in ihrer Empfindlichkeit. Während der Haptenbindungstest im allgemeinen beim unverdünnten Serum durchgeführt wird, sind beim ELISA die Meßergebnisse erst bei Verdünnungen zwischen 1:40 (bei niedrig bindenden Seren) und 1:640 (bei hoch bindenden Seren) sinnvoll. Wie N. Franken zei-

gen konnte, ist der ELISA etwa 200mal empfindlicher als der Haptenbindungstest (8).

Um voll miteinander vergleichbar zu sein, müßten zwei immunologische Tests gleich spezifisch sowohl auf das Antigen, das für die Antikörperbildung auslösend wirkt, als auch auf die gemessenen Antikörper selbst sein. Diese beiden Voraussetzungen sind hier aber leider nicht ganz erfüllt, was vermutlich die unvollständige Korrelation der Meßergebnisse in den beiden Testsystemen erklären könnte.

Der Haptenbindungstest benützt als Antigen das vollständige Pentapeptid der Peptideinheit des Peptidoglycans L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala, während der ELISA nur das C-terminale Ende D-Ala-D-Ala verwendet. Somit könnten mit dem ELISA etwaige Antikörper gegen den N-Terminus des Pentapeptids nicht erfaßt werden. Allerdings wird in der Literatur gerade der C-Terminus als immundominant beschrieben (14, 28, 31, 32), so daß auf den N-Terminus als antigene Determinante vielleicht sogar ohne Nachteil verzichtet werden kann.

Problematischer ist, daß mit dem ELISA nur spezifische Antikörper der Klasse IgG bestimmt werden, die erst relativ spät, einige Wochen, nach einer Infektion im Serum auftreten und noch lange nachweisbar bleiben.

Der Haptenbindungstest erfaßt Immunglobuline der Klassen G, M und A, wobei vor allem das IgM bedeutungsvoll ist, da es schon wenige Tage nach einer Infektion im Serum auftritt und nicht so lang bestehen bleibt wie das IgG. Auf diese Weise können mit dem Haptenbindungstest unter Umständen Änderungen der Antikörperkonzentration entdeckt werden, die dem ELISA entgehen, der zwar empfindlicher ist, aber die ersten auftretenden Antikörper nicht erfassen kann. Dies dürfte wahrscheinlich bei Patienten eine Rolle spielen, die nur über einen kurzen Zeitraum

nach der Sepsis beobachtet werden konnten, weil sie früh entlassen wurden.

Bezüglich der Störanfälligkeit ist dagegen der ELISA wegen der hohen Serumverdünnung dem Haptenbindungstest bei weitem überlegen. N. Franken konnte nachweisen, daß der Rheumafaktor (ein IgM mit Spezifität für IgG), der den Haptenbindungstest erheblich stören kann, nur in extrem hohen Konzentrationen einen Einfluß auf den IgG-Nachweis im ELISA hat (8). Zum gleichen Ergebnis kamen auch P.M. Johnson u.a., die Antikörper gegen Peptidoglycan der Streptokokken bei Patienten mit rheumatoider Arthritis nachwiesen (18).

Zur Diskussion steht auch eine Kreuzreaktivität zwischen β -Lactam-Antibiotika und Peptidoglycan und zwar wegen der Strukturähnlichkeit der Verbindungen (37, 38). In der Diplomarbeit von E. Zauner konnte der Verdacht allerdings nicht bestätigt werden, daß der ELISA durch die üblichen therapeutischen Serumkonzentrationen gehemmt wird (45). Bei meiner Arbeit erschien auch eine Hemmung des Haptenbindungstests durch diese Antibiotika zumindest als sehr unwahrscheinlich. Einige Seren von Patienten, die sehr hochdosiert mit Penicillin G (30 -50 Millionen Einheiten pro Tag) behandelt worden waren, wurden 10 Stunden lang dialysiert (1 ml Serum gegen 1 l PBS), um die β -Lactame zu eliminieren. Die Bindungskapazität der Seren vor Dialyse unterschied sich nicht von der nach Dialyse. A. Zeiger u. a. fanden bei Patienten, die mit β -Lactam-Antibiotika wegen Staph.-aureus-Septikämien und -Endokarditiden behandelt worden waren, sogar signifikant höhere Bindungskapazitäten für Peptidoglycan als bei Kontrollpatienten, die mit Vancomycin behandelt worden waren (46).

Ob und inwieweit beide Testsysteme durch eventuell im Serum vorkommendes freies Antigen beeinflusst werden, das

beispielsweise beim massiven Zerfall von Bakterien entstehen könnte, oder auch in Anwesenheit von Penicillin von den Bakterien kontinuierlich abgegeben werden kann (35, 46, 47), läßt sich erst in weiterführenden Arbeiten klären. Derartige Störungen könnten auch bei anderen heute bereits kommerziell erhältlichen immunologischen Testen das Ergebnis verfälschen. Sicher würde sich freies Antigen auf den ELISA mit seinen hohen Verdünnungsstufen weniger störend auswirken, als auf den Haptenbindungstest.

5.2. Spezifische Ergebnisse bei den verschiedenen Keimen

Damit spezifische Immunreaktionen bei den durch die einzelnen Erreger hervorgerufenen Krankheiten deutlicher erkennbar werden, wurden im Abschnitt 4. bei der Darstellung der Meßwerte die Patienten entsprechend den in der Blutkultur isolierten Bakterien gruppiert.

Bei den Patienten mit Staph.-aureus-Septikämien decken sich die Versuchsergebnisse mit den Erwartungen am besten. Im Haptenbindungstest wiesen alle 9 Patienten eine Bindungskapazität von über 20%, 6 von den 9 Fällen einen Wert von über 40% auf. Bei 5 Patienten stieg die Bindungskapazität im Beobachtungszeitraum um mehr als 10%¹⁾ an, eine Tatsache, die eine immunologische Reaktion des Organismus auf das Antigen beweist. Der Antikörperspiegel gegen D-Ala₃ blieb bei den meisten Patienten lange Zeit auf dem einmal erreichten Niveau bestehen; nur in zwei Fällen (R.K., Tab. 14, Nr. 4, und H.I., 4.2.2.) sank er schon einige

1) Im Rahmen dieser Arbeit ist eine Prozentangabe auch im Zusammenhang mit einem Anstieg oder Abfall als Angabe von Prozentpunkten zu verstehen und nicht als Bruchteil der Ausgangsbindung.

Tage nach dem höchsten Level wieder um ca. 15% ab. Bei dem Patienten L.J. (4.2.3) kam der Anstieg von 8% auf 29% Bindung erst ca. 6 Wochen nach dem Auftreten der Keime im Blut.

Auch im ELISA fielen die Ergebnisse der Staph.-aureus-Patienten erwartungsgemäß positiv aus. Bei 7 Probanden fand sich ein Gehalt an spezifischem IgG von über 40 µg/ml, was deutlich über dem von N. Franken ermittelten Durchschnittswert von 11,6 µg/ml liegt (8). Bei 4 Patienten stiegen die spezifischen Immunglobuline um mehr als die Hälfte des Ausgangswertes an, was sicherlich als signifikant zu bewerten ist.

Bei fast allen Patienten verliefen die Antikörperspiegel im Haptenbindungstest und im ELISA in etwa parallel. Einzige Ausnahme bildete hier die Patientin H.I. (4.2.2.), die im RIA Bindungskapazitäten von 19% bis 40% aufwies, im ELISA dagegen ca. 9 Wochen lang einen Gehalt von weniger als 5 µg/ml spezifisches IgG beibehielt.

Daß sich die Versuchsergebnisse bei den Patienten mit Staph.-aureus-Septikämien mit den nach der Theorie zu erwartenden Ergebnissen decken, steht auch in Einklang mit der Literatur. So berichten B. Christenson u. a. (5, 6), L. J. Wheat (42) und ebenso A. Zeiger (46) über deutlich erhöhte Antikörperspiegel gegen Peptidoglycan von Staph. aureus bei Patienten mit Staph.-aureus-Septikämien und ganz besonders -Endokarditiden im Vergleich zu Patienten mit anderen grampositiven Erkrankungen (z. B. Streptokokken-Septikämien oder leichteren Staph.-aureus-Infektionen) und zu einer gesunden Kontrollgruppe. Auch H. Verbrugh (39) fand in einem ELISA deutlich erhöhte Antikörper gegen Peptidoglycan bei Patienten mit schweren Staph.-aureus-Infektionen gegenüber Patienten mit oberflächlichen Infektionen. D. C. Hooper schließlich (16) entdeckte bei Patienten mit grampositiver Endokarditis

bei künstlichen Herzklappen einen erhöhten Gehalt an zirkulierenden Immunkomplexen.

Die beiden Patienten, bei denen in der Blutkultur Str. pyogenes nachgewiesen worden war, wiesen im Haptenbindungstest einen deutlichen Anstieg der Bindungskapazität innerhalb von zwei Wochen auf: B.H. (4.2.5.) von 32% auf 90%, F.A. (4.2.6.) von 23% auf 48%. Bei der Patientin B.H. könnte der extrem starke Anstieg zumindest teilweise auch iatrogen bedingt sein: Sie war hochdosiert mit Immunglobulinen (6 mal 50 mg Intraglobin pro Tag) behandelt worden.

Erstaunlicherweise fanden sich bei beiden Patientinnen im ELISA keine erhöhten Spiegel an spezifischem IgG. Eine mögliche Erklärung ist, daß die Patientinnen im kurzen Beobachtungszeitraum nur IgM gebildet hatten, das im ELISA nicht nachweisbar ist. Eine allgemeine Aussage über das immunologische Verhalten von Patienten bei septischen Infektionen mit β -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe A ist wegen der geringen Fallzahl leider nicht möglich.

Anders ist der Sachverhalt bei den 11 Patienten mit Sepsiskämien und Endokarditiden durch vergrünende Streptokokken. Hier fanden sich im Haptenbindungstest deutlich niedrigere Bindungskapazitäten als bei Staph.-aureus-Erkrankungen. Bei 6 Patienten lag die Bindungskapazität unter 20%, bei 4 zwischen 20% und 35%, nur bei einer Patientin (O.I., Tab. 14, Nr. 10) wurde eine Bindungskapazität von 70% gemessen. Ebenfalls nur einmal trat eine signifikante Änderung der Antikörperkonzentration auf: beim Patienten A.W. (4.2.7.) ein Abfall der Bindungskapazität von 31% auf 14%.

Ganz ähnlich fielen die Ergebnisse im ELISA aus: 7 von den 11 Patienten hatten für das spezifische IgG eine Kon-

zentration von weniger als 5 µg/ml, kein Patient einen Wert von über 40 µg/ml. Trotz teilweise langer Beobachtungszeiträume änderte sich der Spiegel an spezifischem IgG bei keinem Patienten signifikant. Auffällig war lediglich die Patientin B.O. (4.2.8.), die im RIA mit 10% bis 12% Bindung nur knapp über der Nachweisgrenze lag, aber im ELISA beim spezifischen IgG eine Konzentration von 20 - 30 µg/ml aufwies, die höchste überhaupt gemessene Konzentration in dieser Gruppe von Patienten. Vielleicht ist der im ganzen negative Ausfall der Messungen damit zu erklären, daß vergrünende Streptokokken ganz allgemein wenig immunogen sind. Auch die herkömmliche Methode, der ASO-Test, lieferte - soweit durchgeführt - keine pathologisch erhöhten Titer (höher als 1:320). Dieses Ergebnis paßt auch gut zum klinischen Bild der Str.-viridans-Infektionen: Sie verlaufen meist subakut schleichend und lösen keine starken Reaktionen des Organismus aus wie z. B. hohes Fieber oder stark erhöhte Leukozytenzahlen.

Über die sonstigen Streptokokken ist keine allgemeine Aussage hinsichtlich ihrer Immunogenität möglich, weil jeweils nur ein Proband vorhanden war.

Beim Patienten G.W. (Tab. 14, Nr. 14) mit B-Streptokokken-Sepsis fand sich in beiden Testsystemen ein sehr niedriger Gehalt an spezifischen Immunglobulinen (9% Bindung bzw. 5 µg/ml spez. IgG). Dazu ist anzumerken, daß der Patient an einem inoperablen Magenkarzinom und an dialysepflichtiger Niereninsuffizienz litt, die Sepsis nur um 4 Tage überlebte und somit kaum die Möglichkeit einer immunologischen Reaktion hatte.

Der Patient S.G. (Tab. 14, Nr. 15) mit C-Streptokokken-Sepsis wies innerhalb von 6 Wochen eine Bindungskapazität von 43% - 50% und im ELISA eine IgG-Konzentration

von weniger als 5 µg/ml auf, signifikante Änderungen konnten nicht beobachtet werden.

Als interessant zu erwähnen ist jedoch der 77-jährige R.F. (4.2.10.), der an rezidivierenden Enterokokken (D-Streptokokken)-Septikämien litt: Im langen Beobachtungszeitraum von 3 Monaten schwankte die Bindungskapazität seines Serums zwischen 71% und 86% im Haptenbindungstest und zwischen 345 µg/ml und 110 µg/ml im ELISA. Nach Therapie sank der Antikörperspiegel vorübergehend ab, um bei erneutem Auftreten der Keime im Blut wieder langsam anzusteigen.

Die 4 Patienten mit Pneumokokken-Septikämien wiesen einheitlich einen niedrigen Gehalt an Antikörpern gegen Peptidoglycan auf. Die Werte für die Bindungskapazität lagen im Haptenbindungstest unter 20% und im ELISA unter 5 µg/ml. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß Pneumokokken meist von einer Kapsel umgeben sind und so die Antigene der Zellwand für das Immunsystem nicht zu erkennen sind. Die Pneumokokken werden üblicherweise serologisch nach ihren Kapselantigenen differenziert, die sicher stärker immunogen wirken, als die Zellwand.

Erwartungsgemäß niedrig fielen die Werte bei den meisten Patienten mit E.-Coli-Septikämien aus. Im RIA fanden sich bei 5 der 13 Patienten Bindungskapazitäten von weniger als 20%, bei weiteren 5 von weniger als 40%. Dennoch lag der Mittelwert der Bindungskapazitäten mit 30% leicht über dem Mittelwert bei den Patienten mit vergrünenden Streptokokken ($\bar{x}$ = 26%).

Im ELISA zeigte sich ein noch deutlicher negatives Ergebnis: 8 Patienten hatten in ihren Seren einen Gehalt an spezifischem IgG von weniger als 5 µg/ml, 4 zwischen 5 und 15 µg/ml und nur ein Patient brachte es auf 30 µg/ml.

Die Ergebnisse der Untersuchung an den Patienten mit E.-Coli-Sepsis zeigen klar, daß das Pentapeptid bei gramnegativen Bakterien nicht vorkommt und daher auch keine Antikörper dagegen gebildet werden.

Mehr Überraschung bereiten dagegen diejenigen Patienten, aus deren Blut Klebsiellen isoliert worden waren. Im Haptenbindungstest fanden sich nämlich bei 4 von den 5 Probanden Bindungskapazitäten von über 50%, bei einem allerdings nur von 13%. Der Mittelwert liegt daher mit 49% fast ebensohoch wie bei den Patienten mit Staph.-aureus-Septikämien.

Im ELISA streuten die Konzentrationen von spezifischem IgG sehr stark, nämlich zwischen 7 µg/ml und 65 µg/ml. Beim Patienten D.W. (4.2.12.) stiegen die Antikörperspiegel sogar im RIA wie auch im ELISA signifikant an.

Die Ergebnisse der beiden Patienten mit "sonstigen" gramnegativen Septikämien (Enterobacter cloacae, Proteus mirabilis) waren unauffällig, d.h. es wurden wie zu erwarten weder im Haptenbindungstest noch im ELISA hohe Konzentrationen spezifischer Antikörper nachgewiesen.

Besonders erstaunlich aber ist, daß die höchsten gemessenen Antikörperkonzentrationen gerade bei den Patienten vorkamen, die an einer rein klinisch diagnostizierten Septikämie (d. h. negative Blutkultur) erkrankt waren: Im Haptenbindungstest lagen die Bindungskapazitäten für das Pentapeptid zwischen 72% und 96% ($\bar{x}$ = 82%) und somit weit über den Werten, die bei Patienten mit Staph.-aureus-Septikämien ermittelt wurden.

Ebenso fanden sich im ELISA Konzentrationen von 22, 45, 52 und sogar 410 µg/ml spezifisches IgG (der höchste

überhaupt gemessene Wert. Bei 2 der 4 Patienten stiegen die Antikörperspiegel sowohl im RIA als auch im ELISA im Verlauf der Erkrankung signifikant an.

Man könnte nun darüber spekulieren, ob es gerade die extrem starke Immunreaktion war, die die Keime so schnell aus der Blutbahn eliminierte, daß sie in der Kultur nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Jedoch ist die Anzahl von 4 Patienten zu gering, um einen entsprechenden Verdacht belegen zu können.

5.3. Erörterung einiger grundsätzlicher Probleme

Wenngleich die Ergebnisse der Arbeit in mancher Hinsicht den Erwartungen entsprachen (so bei den Patienten mit Staph. aureus- und E.-Coli-Septikämien), so bleiben doch Ungereimtheiten und Fragen offen. Diese könnten vielleicht mit einigen grundsätzlichen Problemen zusammenhängen, die teilweise erst während der Untersuchung offensichtlich wurden:

1. Das Patientenkollektiv setzt sich zum größten Teil aus Menschen im hohen Lebensalter zusammen (Durchschnittsalter 70,5 Jahre); hierbei ist zu überlegen, ob das Immunsystem noch so gut wie bei jungen Menschen in der Lage ist, spezifisch auf ein bestimmtes Antigen zu reagieren. Diese Annahme wird jedoch durch die Beobachtung wenig wahrscheinlich gemacht, daß die Gammaglobuline in der Serumelektrophorese bei allen Patienten entweder im Normbereich von 10% - 18% (23 Patienten) oder sogar erhöht (31 Patienten) waren. Ebenso lagen bei 12 der 13 Patienten, bei denen die quantitative Immunglobulinbestimmung durchgeführt worden war, die Konzentration an Gesamt-IgG (800 - 2000 mg/dl) und

Gesamt-IgM (60 -300 mg/dl) im Normbereich. Nur jeweils ein Patient (D.W. (4.2.12) bei IgG und W.I. (4.2.11) bei IgM) lag unterhalb des Normbereichs. Dennoch kann durch die eben genannten Befunde eine Schwäche in der spezifischen Immunreaktion nicht ausgeschlossen werden.

2. Neben dem hohen Alter könnten auch die fast immer vorhandenen Begleiterkrankungen einen Einfluß auf die immunologische Situation bei Patienten ausüben. Auszehrende Krankheiten, vor allem maligne Tumoren (8 Patienten) können das Immunsystem schwächen und die Antikörperbildung bei Vorliegen einer grampositiven Sepsis unterdrücken.

Ebenso möglich wäre, daß Patienten neben ihrer Sepsis gleichzeitig andere Infekte mit grampositiven Keimen hatten (z. B. Dekubitus oder chronische Infekte des Nasen-Rachen-Raumes), die einen Anstieg der spezifischen Antikörper bewirkten, obwohl die Septikämie offensichtlich nicht durch Keime dieser Herde zustandekam. So könnten die hohen Antikörperkonzentrationen bei manchen Patienten mit gramnegativer Sepsis erklärt werden.

3. Der mögliche Einfluß einer antibiotischen Therapie auf die immunologische Reaktion ist kaum abzuschätzen, da man ja den Patienten nicht die notwendige Therapie vorenthalten kann, um eine unbehandelte Vergleichsgruppe zu erhalten. Jedenfalls fand A. Zeiger - wie bereits erwähnt (46) - bei Patienten, die mit β -Lactam-Antibiotika behandelt worden waren, höhere Antikörperspiegel gegen Peptidoglycan als bei Patienten, die mit anderen, die mit anderen Antibiotika behandelt worden waren.

Um wenigstens sicher zu erwartende Fehler auszuschlie-

Ben, wurden Patienten, die mit Medikamenten behandelt wurden, die nachweisbar das Immunsystem beeinflussen (Zytostatika und Immunsuppressiva) von vornherein nicht ins Kollektiv aufgenommen.

4. Die Ursachen für unerwartete Ergebnisse müssen aber nicht nur durch besondere Eigenschaften der Patienten oder durch die Therapie bedingt sein; sie können auch bei den Krankheitserregern liegen.
Der eindeutig negative Ausfall der Versuche bei den Erkrankungen mit Streptokokken der Viridans-Gruppe macht die Annahme wahrscheinlich, daß die Keime selbst wenig immunogen sind (s. o.).
5. Ein grundsätzliches, nicht vermeidbares Problem stellt die Tatsache dar, daß der in der Blutkultur isolierte Keim nicht unbedingt der die Krankheit bestimmende sein muß. In manchen Fällen sind mehrere Keime von unterschiedlicher Pathogenität im Blutkreislauf (Mischsepsis); aber nur einer ist für das Krankheitsgeschehen maßgeblich. Hauptsächlich gegen diesen werden vom Organismus die Antikörper gebildet. Trotzdem kann sich in einer Blutkultur ein anderer vielleicht schneller wachsender Keim durchsetzen und so anstatt des eigentlich pathogenen Erregers nachgewiesen werden.
Ebenso kann eine Blutkultur einmal falsch positiv werden, wenn Keime durch Hautkontamination (vor allem Staphylokokken und E. Coli) ins Kulturmedium gelangen. In dieser Arbeit ist mit falsch positiven Blutkulturen allerdings kaum zu rechnen, da nur Patienten ins Kollektiv aufgenommen wurden, die eine eindeutige klinische Symptomatik aufwiesen. Patienten, aus deren Blut Staph. epidermidis, ein typischer saprophyter Hautkeim, isoliert worden war, wurden wegen der Möglichkeit einer Hautkontamination grundsätzlich nicht aufgenommen.

Trotz dieser Schwierigkeiten und offenen Fragen stellen meiner Meinung nach sowohl der ^{125}J -Haptenbindungstest als auch der ELISA Methoden dar, die den herkömmlichen serologischen Möglichkeiten zur Erfassung bakterieller Infektionen zumindest nicht unterlegen sind.

Beim Vergleich mit dem Antistreptolysin-O-Titer ist zu ersehen, daß die Präzision beider in dieser Arbeit verwendeter Testsysteme wesentlich höher ist.

Hinsichtlich Sensibilität und Reproduzierbarkeit ist der ASO den beiden Methoden sicher nicht überlegen. Ein pathologischer ASO-Titer von höher als 1:320 fand sich nur bei der Patientin B.H. (4.2.5.), bei der auch im Haptenbindungstest ein signifikanter Anstieg der Bindungskapazität zu erkennen war.

Gegenüber den in der Literatur beschriebenen Radio-Immuno-Assays (5,14,41,42) und ELISAs (18,39,44) für den Nachweis von Antikörpern gegen Peptidoglycan weisen die hier verwendeten Testsysteme den Vorteil eines genau definierten (weil synthetisch hergestellten) Antigens auf. Die Probleme einer unvollständigen Reinigung oder chemischen Modifikation des Peptidoglycans bei der sonst üblichen Extraktion aus der Zellwand von *Staph. aureus* stellen sich hier nicht.

Die anderen klinisch-chemischen Untersuchungen, wie z. B. BSG, Leukozytenzählung, Differentialblutbild, Serumelektrophorese sowie die quantitative Immunglobulinbestimmung, sind zwar sehr gut geeignet, Entzündungsprozesse im Organismus anzuzeigen, sowie auch Hinweise auf die bakterielle Genese dieser Prozesse zu geben; aber sie sind alle sehr unspezifisch. Rückschlüsse auf die Art der Erreger können aus den klinisch-chemischen Daten nicht gezogen werden. Die ideale Methode zur Diagnose septischer Erkrankungen bleibt somit nach wie vor der Erregernachweis in der Blutkultur. Da dieser aber häufig nicht gelingt, z. B. weil

der Patient bei der Blutentnahme antibiotisch unbehandelt war, können der Haptenbindungstest wie auch der ELISA sicherlich als nützliche Ergänzung diagnostische Hinweise auf das Vorliegen einer grampositiven Sepsis geben. Die beiden Testsysteme erfüllen nach den Ergebnissen dieser Arbeit die in sie gesetzten Erwartungen als Diagnosehilfe zwar nicht überall (z. B. nicht bei den bakteriellen Endokarditiden, die durch vergrünende Streptokokken bedingt sind), wohl aber bei den durch Staph. aureus hervorgerufenen akuten Septikämien.

Der Nachweis von Antikörpern gegen das Pentapeptid des Peptidoglycans macht zwar sicher eine gründliche klinische Untersuchung und die herkömmlichen klinisch-chemischen Methoden niemals überflüssig, kann aber doch in Zukunft wichtige zusätzliche Kriterien für das Zustandekommen der Diagnose "grampositive Septikämie" liefern.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten bei Patienten mit septisch verlaufenden Krankheiten (Septikämien und Endokarditiden) Antikörper gegen das Pentapeptid des Peptidoglycans, ein Epitop der Zellwand grampositiver Bakterien, nachgewiesen werden.

Hierzu wurden von 54 meist älteren Patienten, manchmal über einen längeren Zeitraum verteilt, insgesamt 163 Serumproben gesammelt. In der Blutkultur waren bei 30 Patienten grampositive Erreger (Staph. aureus, Str. pyogenes, vergrünende Streptokokken, B-, C-, D-Streptokokken, Pneumokokken und Corynebakterien), bei 20 Patienten gramnegative Erreger (E. Coli, Klebsiellen, Enterobacter cloacae und Proteus mirabilis) isoliert worden. Bei 4 Patienten konnte kulturell kein Keim nachgewiesen werden.

Zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen das Pentapeptid fanden folgende Testsysteme Verwendung:

- ein Haptenbindungstest (Radio-Immuno-Assay) der spezifische Immunglobuline der Klassen G, M und A gegen das vollständige Pentapeptid L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala erfaßt,
- ein Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA), der spezifische Immunglobuline der Klasse G gegen das immun-dominante C-terminale Ende D-ALA-D-Ala des Pentapeptids erfaßt.

Bei den Patienten, die über einen längeren Zeitraum beobachtet werden konnten und von denen mehrere Serumproben zur Verfügung standen, wurden zusätzlich die Bestimmung des Antistreptolysin-O-Titers sowie die quantitative Messung der Immunglobuline G und M durchgeführt.

Gemäß den Erwartungen zeigten sich bei Patienten mit Staph.-aureus-Septikämien in beiden Testsystemen erhöhte Konzentrationen spezifischer Antikörper, bei den Patienten

mit Str.pyogenes-Septikämien erstaunlicherweise nur im Haptenbindungstest. Wenn vergrünende Streptokokken (Endokarditiden!) oder Pneumokokken in der Blutkultur nachgewiesen worden waren, lagen die Antikörperspiegel in beiden Testsystemen niedrig.

Bei Patienten mit gramnegativen Septikämien fanden sich mit Ausnahme der Patienten mit Klebsiellen-Sepsis wie erwartet niedrige Konzentrationen an spezifischen Antikörpern. Bei Klebsiellen-Sepsis hingegen wurden Konzentrationen gemessen, die fast so hoch waren wie bei Staph.-aureus-Sepsis.

Die höchsten Konzentrationen wurden jedoch zur großen Überraschung bei den Patienten mit negativen Blutkultur-ergebnissen gemessen.

Die Ergebnisse, die mit den beiden Testmethoden erzielt wurden, korrelierten nicht vollständig miteinander, eine Tatsache, die mit den Unterschieden in den beiden Systemen hinsichtlich ihrer Spezifität, Empfindlichkeit und Störanfälligkeit zumindest teilweise erklärt werden kann. Noch verbleibende Schwierigkeiten wurden in Zusammenhang mit verschiedenen grundsätzlichen Fragen gebracht, deren Bedeutung teilweise erst im Lauf der Arbeit hervorgetreten ist und auf die in der Diskussion im einzelnen eingegangen wurde.

Wenn auch der Nachweis von Antikörpern gegen Peptidoglycan nicht alle Erwartungen erfüllte, insbesondere nicht bei den Erkrankungen mit vergrünenden Streptokokken, so könnte ihm in Zukunft doch Bedeutung bei der Diagnose grampositiver Infektionen zukommen.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Abdulla, E.M. und Schwab, J.H. (1965):
 Immunological properties of bacterial cell
 wall mucopeptide.
 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118, 359 - 362
- 2 Adam, A., Petit, J.F., Lefrancier, P. und
 Lederer, E. (1981):
 Muramyl peptides: Chemical structure, bio-
 logical activities and mechanism of action.
 Mol. Cell. Biochem. 41, 27 - 47
- 3 Brandl, A.J.,
 International Textbook of Medicine, Vol. II
 Medical Microbiology and Infection Disease
 W.B. Saunders Company, 5 - 7
- 4 Chetty, Ch., Klapper, D.G. und Schwab, J.H.
 (1982): Soluble peptidoglycan-polysaccharide
 fragments of the bacterial cell wall induce
 acute inflammation.
 Infect. Immun. 38, 1010 - 1019
- 5 Christensson, B., Espersen, F., Hedström, S.A.
 und Kronvall, G. (1982)
 Solid-phase Radioimmunoassay of immunoglo-
 bulin G antibodies to Staphylococcus aureus
 peptidoglycan in patients with staphylo-
 cocal infections.
 Acta path. microbiol. scand. Sect. B 91,
 401 - 406
- 6 Christensson, B., Espersen, F., Hedström, S.A.
 und Kronvall, G. (1982):
 Staphylococcus aureus antibodies in patients
 with staphylococcal septicemia.
 Scand. J. Infect. Dis. 14, 155 - 156
- 7 Eisenberg, R., Fox, A., Greenblatt, J.J. Ander-
 le, S.K., Cromartie, W.J. und Schwab, J.H.
 (1982): Measurement of bacterial cell wall
 In Tissues by solid phase radioimmunoassay:
 correlation of distribution and persistence
 with experimental arthritis in rats.
 Infect. Immun. 38, 127 - 135.

- 8 Franken, N. (1984):
Entwicklung von Enzyme-Linked-Immuno-
sorbent-Assays (ELISA) zur Bestimmung
von Human-IgG-, IgA- und IgM gegen Epi-
tope des Peptidoglycans.
Dissertation, TU München.
- 9 Gerbert, G. (1982):
Untersuchungen zur Reaktion von Human-
seren mit der Peptideinheit des Pepti-
doglycans.
Diplomarbeit, TU München.
- 10 Greenblatt, J.J., Boackle, R.J. und Schwab, J.H.
(1978): Activation of the alternate comple-
ment pathway by petidoglycan from strepto-
coccal cell wall.
Infect. Immun. 19, 296 - 303.
- 11 Greenblatt, J.J., Hunter, N. und Schwab, J.H.
(1980): Antibody response to streptococcal
cell wall antigens associated with experi-
mental arthritis in rats.
Clin. Exp. Immunol. 42, 450 - 457.
- 12 Guenounou, M., Goguel, A.F. und Nauciel, C.
(1982): Study of adjuvant and mitogenic ac-
tivities of bacterial peptidoglycans with
different structures.
Annal. d'Immunol. 133, 3 -13.
- 13 Helgeland, S. und Grov, A. (1975):
Estimation of peptidoglycan antibodies by
an immunoperoxidase technique.
Z. Immun. Forsch. 149, 165 - 167
- 14 Heymer, B., Bernstein, D., Schleifer, K.H.
und Krause, R.M. (1975):
A radioactive haptenbinding assay for
mesuring antibodies to the pentapeptide
determinant of peptidoglycan.
J. Immunol. 114, 1191 - 1196.

- 15 Heymer, B., Schleifer, K.H., Read, S.,
Zabriskie, J.B. und Krause, R.M. (1975):
Detection of antibodies to bacterial cell
wall peptidoglycan in human sera.
J. Immunol. 117, 23 - 26.
- 16 Hooper, D.C., Bayer, A.S., Karchmer, A.W.,
Theofilopoulos, A.N. und Swartz, M.N.
(1983): Circulating immune complexes in
prosthetic valve endocarditis.
Arch.Intern. Med. 143, 2081 -2084.
- 17 IDT, FIAX Test Kit, Immunglobulins G, A and
M (Anleitung zum Test).
- 18 Johnson, P.M., Phua, K.K., Perkins, H.R.,
Hart, C.A. und Bucknall, R.C. (1984):
Antibody to streptococcal cell wall pepti-
doglycan-polysaccharide polymers in sero-
negative rheumatic disease.
Clin. exp. Immunol. 55, 115 - 124.
- 19 Lachmann, P.J. und Peters, D.K. (1982):
Clinical aspects of immunology, Vol.2,
1393 - 1415.
- 20 Libman, H. und Arbeit, R.D. (1984):
Complications associated with Staphylo-
coccus aureus bacteremia.
Arch. Intern. Med. 144, 541 - 544.
- 21 Mast Diagnostica:
Mast-Blue-ASO-Test (Anleitung zum Test)
- 22 Normalbereiche klinisch-chemischer Befunde
in den Städtischen Krankenhäusern Münchens
- 23 Peterson, P.K., Wilkinson, B.J., Schmelling
D., Kim, Y., Douglas, S.D. und Quie, P.G.
(1978): The key role of the peptidoglycan
in the opsonisation of Staphylococcus aureus.
J. Clin. Investigation, 61, 597 - 609.

- 24 Rotta, J. (1975):
Endotoxin-like properties of the peptidoglycan.
Z. Immun. Forsch. 149, 230 - 244.
- 25 Sandritter, W. (1981):
Allgemeine Pathologie, 2. Auflage
F.K. Schattauer Verlag, 49 - 59, 478 - 479.
- 26 Schlegel, H. (1985):
Allgemeine Mikrobiologie, 6. Auflage
Georg Thieme Verlag
S. 42 - 52, S. 82 - 90.
- 27 Schachenmayr, W., Heymer, B. und Haferkamp, O.
(1975): Antibodies to peptidoglycan in the sera from population surveys.
Z. Immun. Forsch. 149, 179 - 186.
- 28 Schleifer, K.H. und Krause, R.M. (1971):
The immunochemistry of the peptidoglycan.
I. The immunodominant site of the peptide subunit and the contribution of each of the amino acids to the binding properties of the peptide.
J. Biol. Chem. 246, 986 - 993.
- 29 Schleifer, K.H. und Krause, R.M. (1971):
The immunochemistry of the peptidoglycan.
II. Separation and characterization of antibodies to the glycan and to the peptide subunit.
Eur. J. Biochem. 19, 471 - 478.
- 30 Schleifer, K.H. und Kandler, O. (1972):
Peptidoglycan types of the bacterial cell wall and their taxonomic implications.
Rev. 36, 407 - 477.
- 31 Schleifer, K.H. und Seidl, H.P. (1974):
The immunochemistry of peptidoglycan. Antibodies against a synthetic immunogen cross-reacting with peptidoglycan.
Eur. J. Biochem. 43, 509 - 519.

- 32 Schleifer, K.H. und Seidl H.P. (1977):
Structure and immunological aspects of
peptidoglycans.
Mikrobiol. 339 - 343.
- 33 Schröder, G. (1982):
Radioimmunologische Untersuchungen am
Peptidoglycan der Bakterienzellwand.
Diplomarbeit TU München.
- 34 Seidl, H.P. und Schleifer, K.H. (1978):
Specific antibodies to the N-termini of
the interpeptide bridges of peptidoglycan.
Arch. Microbiol. 118, 185 - 192.
- 35 Seidl, H.P. und Schleifer, K.H. (1983):
Secretion of fragments from bacterial
cell wall peptidoglycan.
- 36 Siegenthaler, W., Kaufmann, W., Hornbostel, H.
und Waller, H.D. (1984):
Lehrbuch der inneren Medizin.
Georg Thieme Verlag, 11.2. - 11.17.
- 37 Stöcklein, L. (1979):
Spezifische Bindung von β -Lactam-Antibioti-
ka an Antiserum gegen Peptidoglycan gemes-
sen mit einem H-Haptenbindungstest.
Diplomarbeit, TU München.
- 38 Tipper, D.J. und Strominger, J.L. (1965):
Mechanism of action of penicillins: a pro-
posal based on their structural similarity
to acyl-D-alanyl-D-alanine.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 54, 1133 - 1141.
- 39 Verbrugh, H.A., Peters, R., Rosenberg-Arzska,
M., Peterson, P.K. und Verhoef, J. (1981):
Antibodies to cell wall peptidoglycan of
Staphylococcus aureus in patients with
serious staphylococcal infections.
J. Infect. Dis. 144, 1 - 19.

- 40 Wheat, L.J., Kohler, R.B. und White, A. (1978):
Solid-phase radioimmunoassay for immunoglobulin G Staphylococcus aureus antibody in serious staphylococcal infection.
Inter. Med. 89, 467 - 472.
- 41 Wheat, L.J., Kohler, R.B., Tabbarah, Z.A. und White, A. (1981):
IgM antibody response to staphylococcal infections.
J. Infect. Dis. 144, 307 - 311.
- 42 Wheat, L.J., Wilkinson, B.J., Kohler, R.B. und White, A. (1983):
Antibody response to peptidoglycan during staphylococcal infections.
J. Infect. Dis. 147, 16 - 22.
- 43 Wiesmann, E. (1982):
Medizinische Mikrobiologie, 5. Auflage
Georg Thieme Verlag, 22-48, 61-68, 110-154.
- 44 Wilhelm, J.A., Matter, L. und Schopfer, K. (1982): IgG, IgA und IgM antibodies to S. aureus purified cell walls in normal and S. aureus infected individuals.
Experienta 38, 1375.
- 45 Zauner, E. (1983):
Kreuzreaktivität zwischen Antikörpern mit Spezifität für die Pentapeptid-Sequenz R-D-Ala₂ des Peptidoglycans und β -Lactamen.
Diplomarbeit, TU München.
- 46 Zeiger, A.R., Tuazon, C.U. und Sheagran, J.N. (1981): Antibody levels to bacterial peptidoglycan in human sera during the time course of endocarditis and bacteremic infection caused by Staphylococcus aureus.
Infect. Immun. 33, 795 - 800.
- 47 Zeiger, A.R., Wong, W., Chatterjee, A.N., Young, F.E. und Tuazon, C.L. (1982):
Evidence for the secretion of soluble peptidoglycan by clinical isolates of Staphylococcus aureus.
Infect. Immun. 37, 1112 - 1118.

Lebenslauf

18.09.1961	geboren in München als erste Tochter von Dr. Konrad Schmittlein und seiner Ehefrau Traudlinde Schmittlein, geb. Markl
1967 - 1971	Volksschule Grünwald
1971 - 1980	neusprachliches Gymnasium Pullach
Juni 1980	Abitur Stipendium für besonders Begabte
1980 - 1982	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Regensburg (Vorklinik)
August 1982	Ärztliche Vorprüfung
1982 - 1986	Fortsetzung des Medizinstudiums an der Universität München
August 1983	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mai 1983 - Okt. 1984	Durchführung der klinischen und laborchemischen Untersuchungen der vorliegenden Doktorarbeit am klinisch-chemischen Institut des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching und am Institut für Mikrobiologie der TU München unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. L. Weiß und Herrn Prof. Dr. H. Kolb
März 1985	zusätzliche Famulatur an der Universitätsklinik St. Antoine in Paris
August 1985	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Okt. 1985 - Sept. 1986	Praktisches Jahr Innere: Med. Klinik I, Großhadern Chirurgie: Städt. Krankenhaus Rosenheim Pädiatrie: v. Haunersche Kinderklinik, davon 2 Monate am Red Cross Hospital in Kapstadt
November 1986	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Dezember 1986	Approbation als Arzt
Ab Jan. 1987	hauptberufliche wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Anaesthesiologie der Universität München

Bei meinen Untersuchungen habe ich vielfache Unterstützungen erfahren, für die ich mich an dieser Stelle nochmals bedanken darf.

Vor allem danke ich sehr herzlich Herrn Professor Dr. L. Weiß, unter dessen Leitung diese Arbeit am klinisch-chemischen Institut des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching angefertigt wurde.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. H. Kolb für seine freundliche Betreuung und die guten Ratschläge bei der Durchführung der Arbeit bedanken.

Sehr zu danken habe ich auch Herrn Professor Dr. K.H. Schleifer für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Institut für Mikrobiologie der TU München und seinen Mitarbeitern für ihre freundliche Anleitung im Labor.

Zu großem Dank bin ich auch den Ärzten des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching verpflichtet, die mich bei Fragen zum klinischen Teil der Arbeit immer bereitwillig unterstützten.

Frau Brigitte Kellner danke ich sehr für ihre freundliche Hilfe bei den Laborarbeiten in Harlaching.

